

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

FLÁVIA MENDES PERADELES GALDINO

**EFEITOS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS) NO PRÉ-
TRATAMENTO E TRATAMENTO SOBRE A MUCOSITE
INTESTINAL, INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL, EM MODELO
EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte - MG
2017

FLÁVIA MENDES PERADELES GALDINO

**EFEITOS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS) NO PRÉ-
TRATAMENTO E TRATAMENTO SOBRE A MUCOSITE
INTESTINAL, INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL, EM MODELO
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Simone Odília A. Fernandes

Belo Horizonte - MG
2017

Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Nair, ao meu irmão, Paulo Henrique e ao meu marido, Lucas, que sempre me incentivaram e ultrapassaram diversos obstáculos para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade de aprender a cada dia e por colocar pessoas abençoadas em meu caminho.

Aos meus pais, Celso e Nair e ao meu irmão Paulo pelo amor, apoio, compreensão e por acreditarem em mim.

Ao meu marido Lucas pela compreensão, amor e por sempre me apoiar e incentivar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso que me recebeu de braços abertos em seu laboratório e com toda paciência me guiou neste trabalho.

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Simone Odília Antunes Fernandes por sempre estar disposta a me auxiliar e por me apoiar desde o primeiro dia no laboratório.

A Dr^a. Maria Emília Rabelo Andrade que sempre me auxiliou e me ensinou com muita paciência e carinho e também pelas inúmeras sugestões, considerações e discussões de ideias.

A Dr^a. Patrícia Aparecida Vieira de Barros que me ajudou em diversos momentos do trabalho e me auxiliou na discussão dos resultados.

A Prof^a. Dr^a. Simone de Vasconcelos Generoso por ser tão prestativa e por contribuir de maneira tão valiosa neste trabalho com valiosas ideias e considerações.

A aluna de mestrado Isabella Kuniko pelo auxílio em diversos momentos da elaboração deste trabalho em especial pelo auxílio na coleta do material para histologia.

Ao Farmacêutico Vanderli Pacheco por toda ajuda e paciência no laboratório, pelo fornecimento de materiais para os experimentos e pela amizade.

A Adelaide Fernandes e ao Batista Vitorino pelo auxílio desde o início com os animais no Biotério e também pelo carinho e atenção.

As alunas de iniciação científica Ítala Marzano, Maira Santos, Patrícia, Nara, Diego que me ajudaram muito nos dias de experimento.

Ao mestrando Sued Miranda, por sempre estar disposto a ajudar e pelo apoio em todos os experimentos.

A Prof^a. Dr^a. Jaqueline Isaura Alvarez Leite e sua aluna de Pós Doutorado Dr^a. Paola Caroline pela colaboração nas análises de estresse oxidativo e infiltrado inflamatório e pelas discussões dos resultados.

A Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Peluzio pela colaboração nas análises de ácidos graxos de cadeia curta.

A Prof^a. Dr^a Camila Megale de Almeida Leite e sua aluna de doutorado Grazielle M.F. Costa pela colaboração nas análises histológicas.

As minhas amigas do CEFET-MG Livia Dantas e Marta Venuto, pelo apoio e colaboração neste momento de intenso trabalho.

Ao CEFET- MG pela flexibilização de horários para que eu pudesse realizar os experimentos.

A todos meus familiares e amigos pelo carinho e incentivo.

RESUMO

Dados da literatura têm mostrado efeitos benéficos da utilização do prebiótico frutooligossacarídeos (FOS) em doenças intestinais, como: atividade anti-inflamatória, modulação da microbiota intestinal e aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do pré-tratamento e do tratamento com FOS na mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) e investigar possíveis mecanismos envolvidos na ação deste prebiótico. Para tanto, camundongos Balb/c, machos com 6 semanas de idade, com peso entre 25 e 30 g foram divididos em 5 grupos: Controle (sem mucosite + solução salina), FOS (sem mucosite + 6 % de FOS), MUC (com mucosite + solução salina), PT (com mucosite + suplementação com 6 % de FOS antes da indução da doença) e T (com mucosite + suplementação com 6 % de FOS após a indução da doença). Os animais (n=6) foram alimentados com dieta comercial e suplementados com FOS via gavagem. A mucosite foi induzida com uma única injeção intraperitoneal (300 mg/kg) de 5-FU. Após 72 horas da injeção, os camundongos receberam, por gavagem, 18,5 MBq de ^{99m}Tc-DTPA para avaliação da permeabilidade intestinal (PI); 4 horas após a administração, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado para contagem de radioatividade. O íleo foi removido para avaliação do infiltrado inflamatório, estresse oxidativo e análise histológica. As fezes foram coletadas para análises do AGCC. Os dados mostraram que antes da indução da mucosite não se observaram modificações para o consumo de ração e variação ponderal nos diversos grupos investigados. Entretanto, após a indução da doença observou-se redução de ambos parâmetros para o grupo MUC e a suplementação com FOS não foi capaz de prevenir a redução observada para o consumo e perda de peso. Os animais que receberam o FOS mostraram níveis fisiológicos de permeabilidade intestinal (PI). Observou-se aumento das atividades de MPO e EPO no grupo MUC em relação aos outros grupos ($p \leq 0,05$); o mesmo não se verificou com relação a NAG ($p \geq 0,05$). Na avaliação do estresse oxidativo observou-se redução da atividade da enzima SOD nos animais dos grupos MUC, PT e T em relação ao controle CTL ($p \leq 0,05$). Por outro lado, observou-se aumento da enzima catalase nos animais que foram suplementados com FOS em relação ao grupo MUC ($p \leq 0,05$). Os dados histológicos mostraram preservação parcial da arquitetura intestinal no íleo dos animais suplementados com o FOS. O pré-

tratamento com FOS aumentou os níveis dos AGCC acetato e butirato quando comparado com o grupo MUC ($p \leq 0,05$). A suplementação com FOS reduziu o infiltrado inflamatório, preservou parcialmente a mucosa intestinal, reduziu a permeabilidade intestinal e aumentou os níveis de catalase. O pré-tratamento mostrou ser mais eficaz na produção dos AGCC acetato e butirato, indicando modulação da microbiota intestinal tempo dependente.

Palavras-chave: Mucosite intestinal. 5-fluorouracil. Frutooligossacarídeos. Estresse oxidativo

ABSTRACT

Literature data have shown beneficial effects of the use of prebiotic fructo-oligosaccharides (FOS) in intestinal diseases, as an anti-inflammatory activity, intestinal microbiota modulation and increase in the production of short chain fatty acids (SCFA). The goal of the present study was to evaluate the effects of FOS pre-treatment and treatment on intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil (5-FU) and investigate possible mechanisms involved in the action of this prebiotic. For this purpose, Balb / c mice, 6 weeks old, weighing between 25 and 30 g were divided into 5 groups: Control (without mucositis + saline), FOS (without mucositis + 6 % FOS), MUC (mucositis + saline solution), PT (mucositis + supplementation with 6 % of FOS before of disease induction) and T (mucositis + supplementation with 6 % of FOS after disease induction). The animals (n = 6) were fed with a commercial diet and supplemented by gavage. Mucositis was induced with a single intraperitoneal injection (300 mg / kg) of 5-FU. After 72 hours of the injection, mice received 18.5 MBq of ^{99m}Tc-DTPA by gavage for evaluation of intestinal permeability (PI); 4 hours after administration the animals were euthanized and blood was collected for radioactivity counting. The ileum was also removed for evaluation of inflammatory infiltrate, oxidative stress and histological analysis. Feces were collected for SCFA analysis. The data showed that before of mucositis induction no modifications were observed for feed intake and weight variation to different groups investigated. However, after induction of the disease, there was a reduction of both parameters to MUC group and FOS supplementation was not able to prevent the reduction observed for consumption and weight loss. Animals that received FOS showed physiological levels of intestinal permeability (PI). MPO and EPO activities were increased in the MUC group in relation to the other groups ($p \leq 0.05$); the same did not occur in relation to NAG ($p \geq 0.05$). Regarding to oxidative stress, a reduction of the SOD enzyme activity was observed in the animals of the MUC, PT and T groups in relation to the CTL ($p \leq 0.05$). On the other hand, an increase of the catalase enzyme was observed in the animals that were supplemented with FOS in relation to the MUC group ($p \leq 0.05$). Histological data showed partial preservation of intestinal architecture in the ileum of animals supplemented with FOS. Pretreatment with FOS increased levels of SCFA acetate and butyrate when compared to the MUC group ($p \leq 0.05$). FOS supplementation reduced inflammatory infiltrate, partially preserved

intestinal mucosa, reduced intestinal permeability, and increased levels of catalase. Pretreatment showed to be more efficient in the production of SCFA acetate and butyrate, indicating intestinal microbiota modulation time-dependent.

Key words: Intestinal mucositis. 5-fluorouracil. Fructo-oligosaccharides. Oxidative stress

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos.....	23
Figura 2- Epitélio intestinal saudável e lesionado.....	41
Figura 3- Estrutura química do 5-FU.....	43
Figura 4- Modelo fisiopatológico da mucosite em cinco fases, do surgimento da doença à recuperação do tecido.....	48
Figura 5- Delineamento experimental.....	54
Figura 6- Variação do consumo alimentar (A) e variação do peso (B) antes da indução da mucosite (1 ^o ao 6 ^o dia).....	65
Figura 7- Variação do consumo alimentar (A) e variação do peso (B) após a indução da mucosite (7 ^o ao 10 ^o dia).....	66
Figura 8- Permeabilidade Intestinal 72 horas após a indução da mucosite.....	67
Figura 9- Imagens histológicas.....	68
Figura 10- Escore histológico.....	69
Figura 11- Infiltrado inflamatório no íleo.....	70
Figura 12 – Avaliação do estresse oxidativo no íleo.....	71
Figura 13- Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeitos do uso do FOS em modelos animais.....	30
Tabela 2- Resumo dos efeitos fisiológicos dos AGCC.....	38
Tabela 3- Escore histológico.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
^{99m} Tc	Tecnécio-99m
^{99m} Tc - DTPA	DTPA marcado com tecnécio-99m
ADMO	Oligossacarídeos marinhos derivados de algas
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AMP	Adenosina monofosfato ou monofosfato de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOS	Arabinooligosacarídeos
BHT	Hidroxitolueno butilado
CD	Ciclodextrinas
CeBio	Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG
cpm	Contagens por minuto
CTL	Controle
DHFU	Diidrofluorouracil
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPD	Diidropirimidinadesidrogenase
DRIs	<i>Dietary Reference Intakes</i>
DTPA	Ácido dietileno-triaminopentacético
EPO	Peroxidase de eosinófilos
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FdUMP	Fluorodeoxiuridinamonofosfato
FdUTP	Fluorodeoxiuridina trifosfato
FOS	Frutooligosacarídeos
FOX	Solução de xilenol laranja e sulfato ferroso amoniacal
FUTP	Fluorouridina trifosfato
G	Gramas
GALT	Tecido linfático associado ao intestino
GOS	Galactooligosacarídeos
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina e eosina
HETAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMO	Oligossacarídeos de leite humano
IECs	Células epiteliais intestinais
IFN-γ	Interferon-gama
IFN-γ	Interferon-γ
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IMO	Isomaltooligosacarídeos
IP	Injeção intraperitoneal
LDGOS	Galactooligosacarídeos derivados de lactose
LP	Lâmina própria

MBq	Megabecquerel
MDA	Malondialdeído
mL	Miligramas
MOS	Maltooligosacarídeos
MPO	Mieloperoxidase
MUC	Mucosite
NAG	N-acetilglicosaminidase
NF-κB	Fator nuclear – Kappa B
nm	Nanômetro
OPD	1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina
pAOS	Oligossacarídeos ácidos pectínicos
PBS	Solução de tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Permeabilidade Intestinal
PMN	Polimorfonuclear
PMNs	Polimorfonucleares
PT	Pré-tratado
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por Minuto
SEM	Desvio padrão da média
SOD	Superóxido Dismutase
T	Tratado
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TGI	Trato gastrointestinal
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPP	Trifenilfostina
TRL	Receptores <i>Toll-like</i>
XOS	Xilooligosacarídeos
μg	Micrograma
μL	Microlitro
ZO	Zona ocludente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Prebióticos.....	18
2.2 Frutooligossacarídeos.....	21
2.2.1 Definição / classificação.....	21
2.2.2 Características.....	23
2.2.3 Fontes e consumo.....	25
2.2.4 Síntese	25
2.2.5 Benefícios do FOS no trato gastrointestinal.....	26
2.2.5.1 Modulação da microbiota intestinal.....	26
2.2.5.2 Trânsito intestinal.....	28
2.2.5.3 Doenças intestinais.....	29
2.2.5.4 Modulação Imunológica.....	30
2.2.5.5 Produção de ácidos graxos de cadeia curta.....	33
2.2.5.5.1 Butirato.....	35
2.2.5.5.2 Propionato.....	36
2.2.5.5.3 Acetato	37
2.3 Barreira intestinal.....	39
2.4 Quimioterápico 5-fluorouracilo (5-FU).....	42
2.5 Mucosite intestinal.....	44
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 Animais	52
4.2 Delineamento experimental.....	52
4.3 Modelo experimental de mucosite intestinal.....	53
4.4 Dieta e suplementação.....	54
4.5 Análises	55
4.5.1 Consumo alimentar.....	55
4.5.2 Variação ponderal.....	55
4.5.3 Estudo da permeabilidade intestinal.....	56
4.5.4 Análises histológicas.....	57
4.5.5 Análise do infiltrado inflamatório através da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO), peroxidase de eosinófilos (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG).....	58
4.5.6 Análise do estresse oxidativo no íleo.....	60
4.5.6.1 Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS.....	60
4.5.6.2 Dosagem da concentração de hidroperóxidos	61
4.5.6.3 Dosagem da atividade da enzima superóxido dismutase.....	62
4.5.6.4 Dosagem da atividade da enzima catalase.....	63
4.5.6.5 Dosagem de proteína.....	63
4.5.7 Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes.....	63
4.5.8 Análises estatísticas.....	64
5 RESULTADOS.....	65
5.1 Consumo alimentar e variação ponderal.....	65
5.2 Permeabilidade intestinal.....	66
5.3 Análises histológicas.....	67

5.4 Avaliação do infiltrado inflamatório.....	69
5.5 Avaliação do estresse oxidativo.....	70
5.6 Dosagem de ácidos graxos nas fezes.....	72
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÃO.....	83
8 PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	102

1 INTRODUÇÃO

O 5-Fluorouracil (5-FU) é um agente quimioterápico utilizado no tratamento de carcinomas metastáticos de cólon, carcinomas do trato gastrointestinal superior, de mama e adenocarcinomas de cabeça e pescoço (LOGAN *et al.*, 2009; LONGLEY; G., 2003). A utilização desse fármaco causa danos na mucosa intestinal alterando sua morfologia com aumento da infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, bem como aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, provoca efeitos colaterais adversos (ABDELOUHAB *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2008).

A mucosite é relatada como um efeito secundário à quimioterapia com 5- FU, acometendo o trato gastrointestinal de aproximadamente 50% dos pacientes em tratamento (TANG *et al.*, 2017). Essa doença afeta profundamente a qualidade de vida dos pacientes, algumas vezes acarretando a interrupção do tratamento ou redução da dose dos quimioterápicos nas terapias contra o câncer. A diarreia e o vômito aparecem como efeitos adversos frequentes, contribuindo para o aumento dos custos com saúde, prolongada permanência hospitalar e comprometimento do estado nutricional dos pacientes (ALA *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2012).

Desta forma, novas abordagens terapêuticas no tratamento da mucosite são necessárias. A utilização de imunonutrientes e imunomoduladores tem sido relatada, dentre estes está a utilização de prebióticos e probióticos. Cada vez mais tem se explorado a modulação da microbiota intestinal como uma nova estratégia para combater vários distúrbios que afetam o trato gastrointestinal (BELORKAR; GUPTA, 2016; FLINT; DUNCAN; SCOTT, 2007; RAJKUMAR *et al.*, 2015).

Os prebióticos atuam como substrato de fermentação, estimulando o crescimento e a atividade do micro-organismo ou do grupo de micro-organismos específico de interesse e, conseqüentemente, leva ao efeito desejado sobre a saúde (GIBSON *et al.*, 2010; ROBERFROID, 2007). Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são polissacarídeos que têm demonstrado bons efeitos prebióticos, “alimentando” seletivamente algumas espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, desta maneira, reduzindo a quantidade de outras bactérias como *Bacteroides*, *Clostridium* e Coliformes (BOUHNİK *et al.*, 2007; DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010). A incorporação de FOS na dieta ou uma suplementação intensificam a viabilidade e

adesão dessas bactérias benéficas no trato gastrointestinal, mudando a composição de sua microbiota (BELORKAR; GUPTA, 2016; FLORES-MALTOS *et al.*, 2016; SCHAGGER; CRAMER; VONJAGOW, 1994).

Dados da literatura têm apontado efeitos benéficos da utilização de FOS no tratamento da mucosite e outras doenças intestinais (CHERBUT; MICHEL, 2003; GOTO *et al.*, 2010; KOLEVA *et al.*, 2012; SMITH *et al.*, 2008). Dentre seus benefícios, o aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) tem se destacado. Os AGCC podem ser utilizados pelo organismo hospedeiro para diversas finalidades e, geralmente, estão ligados aos benefícios à saúde como: proliferação das células da mucosa, controle da inflamação, da carcinogênese, da absorção mineral e eliminação de compostos nitrogenados, além de gases (H₂, CO₂, CH₄), por meio do processo de fermentação (DELZENNE, 2003; FLORES-MALTOS *et al.*, 2016; RIVIERE *et al.*, 2016; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009).

Baseado nestas evidências, a hipótese deste trabalho é que o pré-tratamento e/ou o tratamento com FOS seja capaz de prevenir ou atenuar as respostas inflamatórias intestinais induzidas pelo 5-FU. O presente estudo reveste-se de importância e relevância para futuras aplicações tanto em pesquisa quanto na prática clínica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Prebióticos

Os prebióticos podem ser definidos como ingredientes alimentares seletivamente fermentados pelo hospedeiro que conduzem a mudanças específicas na composição e/ou atividade de sua microbiota gastrointestinal, estimulando o crescimento e a atividade do micro-organismo ou do grupo de micro-organismos específico de interesse, as quais estão associadas a benefícios para a saúde e bem-estar do mesmo (AZIMIRAD *et al.*, 2016; BOWEN; GIBSON; KEEFE, 2011; GIBSON *et al.*, 2010; ROBERFROID, 2007).

A definição dos prebióticos foi discutida e aprimorada várias vezes desde que foi introduzida em 1995 pelos autores Gibson e Roberfroid. No entanto, a maioria das definições concorda com a exigência de que os prebióticos precisam ser "específicos" e/ou "seletivos" a fim de promover a saúde ou atividades metabólicas benéficas (BINDELS *et al.*, 2015; VANDEPUTTE *et al.*, 2017).

As substâncias prebióticas são consideradas fibras alimentares, no entanto nem toda fibra pode ser considerada um prebiótico. As fibras podem ser classificadas como solúveis, insolúveis ou mistas, podendo ou não sofrer fermentação (CARABIN; FLAMM, 1999).

Para um ingrediente ser classificado como prebiótico, deve ser demonstrado, por meio de estudos científicos *in vitro* e imprescindivelmente *in vivo*, que o mesmo atende a alguns critérios. Em primeiro lugar, os prebióticos devem resistir à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à absorção no trato gastrointestinal (TGI). Tal resistência não necessariamente implica que o prebiótico seja completamente indigerível, mas deve garantir que uma proporção significativa do mesmo fique disponível como substrato para a fermentação intestinal, especialmente no cólon. Em segundo lugar, estes devem sofrer fermentação pela microbiota intestinal e, em terceiro lugar, devem estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de bactérias intestinais que contribuem para a saúde e o bem-estar, destacando-se em particular o aumento de bifidobactérias e de lactobacilos (bifidogênese) (GIBSON *et al.*, 2004; WILSON; WHELAN, 2017).

A necessidade de estimulação bacteriana seletiva para permitir o efeito benéfico na saúde do hospedeiro ainda é questionada. Muitos benefícios associados à ação dos prebióticos são atribuídos à fermentação saccharolítica

aumentada e ao resultante aumento da produção de AGCC, aspectos comuns entre as bactérias do cólon. Assim, uma opinião emergente no campo das investigações é que a exigência de seletividade da estimulação prébiótica é rigorosamente desnecessária, opinião que cresceu e se tornou um tópico de debate acirrado, tanto na academia quanto na indústria (VANDEPUTTE *et al.*, 2017).

Para confirmar a seletividade de um prebiótico, é de extrema importância monitorar com precisão as alterações na microbiota fecal durante a suplementação prebiótica tanto *in vitro* como *in vivo*. Embora ambos os critérios sejam importantes para que um ingrediente dietético seja caracterizado como prebiótico, a seletividade é o mais importante e difícil de cumprir (KOLIDA; GIBSON, 2011).

As bactérias consideradas promotoras da saúde na literatura dos prebióticos são em grande parte restritas aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Contudo, é difícil garantir que um oligossacarídeo não digerível será fermentado apenas por bactérias benéficas para o hospedeiro e também que os produtos de fermentação não serão utilizados para promover o crescimento e/ou a atividade de potenciais agentes patogênicos (BINDELS *et al.*, 2015; KOLIDA; GIBSON, 2011; RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001).

Diversos estudos têm demonstrado os benefícios dos prebióticos em modelos experimentais e clínicos. Os prebióticos podem reduzir a incidência de doenças degenerativas, tais como neoplasias, diabetes, doenças coronárias e infecções. Eles também parecem promover uma modulação positiva do sistema imunológico. Além disso, o consumo de prebióticos estimula a produção de AGCC e melhora o funcionamento intestinal, aumentando a frequência e melhorando a consistência das fezes; reduz o risco de infecções e gastroenterites; aumenta a absorção de cálcio, com acréscimo de cálcio ósseo e densidade mineral óssea (CHOQUE DELGADO *et al.*, 2012; GIBSON *et al.*, 2010; KOLIDA; GIBSON, 2011; WU *et al.*, 2017). Há relatos na literatura, que os prebióticos parecem também influenciar locais distantes, como ossos e pele, aparentemente por meio do aumento de bactérias benéficas no intestino e os produtos resultantes da fermentação dessas bactérias atingindo células alvo (COLLINS; REID, 2016).

Os prebióticos têm várias vantagens sobre os probióticos: maior resistência à barreira digestiva, menores custos, menores riscos e relativa facilidade na incorporação na dieta (WANG *et al.* 2017). Os probióticos são considerados como bactérias inofensivas, mas com possíveis efeitos colaterais potencialmente graves,

como, por exemplo, desenvolvimento de sepse, crescimento de colônias bacterianas estranhas, translocação bacteriana e transferência de genes de resistência em populações bacteriana (HONEYCUTT *et al.*, 2007; LIONG, 2008; YEN *et al.*, 2011). Algumas bactérias probióticas têm como mecanismo de ação uma forte adesão à mucosa intestinal, o que pode aumentar a translocação bacteriana e a virulência, tornando-as perigosas. Os fatores de risco para o desenvolvimento de infecções por esses micro-organismos parecem ser predominantemente o imunocomprometimento ou neutropenia prolongada, como no caso de pacientes transplantados, pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), com câncer, em uso de antibióticos, pós-cirúrgicos e em uso de radioterapia. Como há relatos na literatura científica que um número expressivo de infecções pode estar relacionado aos probióticos, tem-se questionado sobre a segurança na indicação desse tipo de produto para pacientes em estado crítico, principalmente em imunocomprometidos (LIONG, 2008; UNTERKIRCHER *et al.*, 2012). Assim, os prebióticos se tornam uma alternativa de tratamento mais segura para esses pacientes.

Existe uma série de prebióticos com várias origens e propriedades químicas. Stowell (2007) revisaram os prebióticos existentes e os classificaram com base em critérios comuns. Inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), lactulose e a polidextose são reconhecidos como os prebióticos estabelecidos, enquanto que isomaltoligosacarídeos (IMO), xilooligosacarídeos (XOS) são classificados como prebióticos emergentes. Manitol, maltodextrina, rafinose, sorbitol também são definidos como prebióticos por alguns autores (HERNANDEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2012; PATEL; GOYAL, 2012).

De acordo com outros autores, os três carboidratos principais que preenchem os critérios para os prebióticos são frutanos do tipo inulina, os GOS e os FOS, embora muitas outras classes estejam sob investigações (KOLIDA; GIBSON, 2011; WILSON; WHELAN, 2017; YU *et al.*, 2017). Pesquisas mostram que oligossacarídeos não digeríveis tais como a inulina e o fruto-oligossacarídeos estão entre os mais promissores prebióticos (AZIMIRAD *et al.*, 2016).

A ANVISA aprova alegação de propriedade funcional apenas para o FOS e inulina, considerando-os como prebióticos. Alimentos e produtos prontos para consumo que forneçam no mínimo 5 g de FOS ou inulina (mínimo 2,5 g de FOS ou inulina por porção) podem utilizar a seguinte alegação no rótulo “Os fruto-oligossacarídeos (FOS) e inulina contribuem para o equilíbrio da microbiota

intestinal”. No entanto, esses produtos devem ser registrados na ANVISA para utilização da alegação (ANVISA, 2016).

2.2 Fruto-oligossacarídeos (FOS)

2.2.1 Definição / classificação

A inulina, oligofrutose e/ou FOS pertencem a uma classe de carboidratos denominados frutanos. Frutano é um termo genérico empregado para descrever todos os oligo ou polissacarídeos de origem vegetal e refere-se a qualquer carboidrato em que uma ou mais ligações frutossil-frutose predominam dentre as ligações glicosídicas. Os frutanos são polímeros de frutose linear ou ramificada ligados por ligações β (2 \rightarrow 1) ou β (2 \rightarrow 6), encontradas, respectivamente, na inulina e nos frutanos do tipo levanos. Os frutanos são os polissacarídeos não estruturais mais abundantes na natureza, após o amido. Eles estão presentes em grande variedade de vegetais e também em algumas bactérias e fungos (CARABIN; FLAMM, 1999; KYAZZE *et al.*, 2008).

A inulina é geralmente derivada da chicória, e sua hidrólise parcial produz oligofrutose, que também é comumente conhecido como FOS (DI BARTOLOMEO; VAN DEN ENDE, 2015). Outros oligossacarídeos mais populares são: GOS, Galactooligossacarídeos derivados de lactose (LDGOS), Xilooligosacarídeos (XOS), Arabinooligosacarídeos (AOS), oligossacarídeos marinhos derivados de algas (ADMO). Oligossacarídeos que ocorrem na natureza são oligossacarídeos ácidos pectínicos (pAOS), malto-oligossacarídeos (MOS), ciclodextrinas (CD) e oligossacarídeos de leite humano (HMO) com benefícios específicos reconhecidos (BELORKAR; GUPTA, 2016).

A oligofrutose e os FOS são termos sinônimos utilizados para denominar frutanos do tipo inulina com grau de polimerização inferior a 10. A utilização dos termos inulina, fruto-oligossacarídeo e oligofrutose se confunde e não é uniforme nos artigos de pesquisa (KELLY, 2008). O termo oligofrutose é mais empregado na literatura para descrever inulinas de cadeia curta, obtidas por hidrólise parcial da inulina da chicória. O termo FOS tende a descrever misturas de frutanos do tipo inulina de cadeia curta, sintetizados a partir da sacarose (CARABIN; FLAMM, 1999; ROBERFROID, 2005; SIVIERI *et al.*, 2014).

Os FOS consistem em unidades de frutose polimerizadas em diferentes graus, é um nome comumente dado apenas a oligômeros de frutose que são compostos de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutossil-nistose (GF4), em que as unidades de frutossil são ligadas na posição β -2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (figura 1) (BELORKAR; GUPTA, 2016; PASSOS; PARK, 2003). Kestose é formada pela adição de uma (01) molécula de frutose à sacarose, a enzima que realiza esta reação é a sacarose 1-fructosiltransferase, a nistose é formada por adição de duas (02) moléculas de frutose à sacarose e a adição de mais frutose na molécula formará a fructossil- nistose (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001).

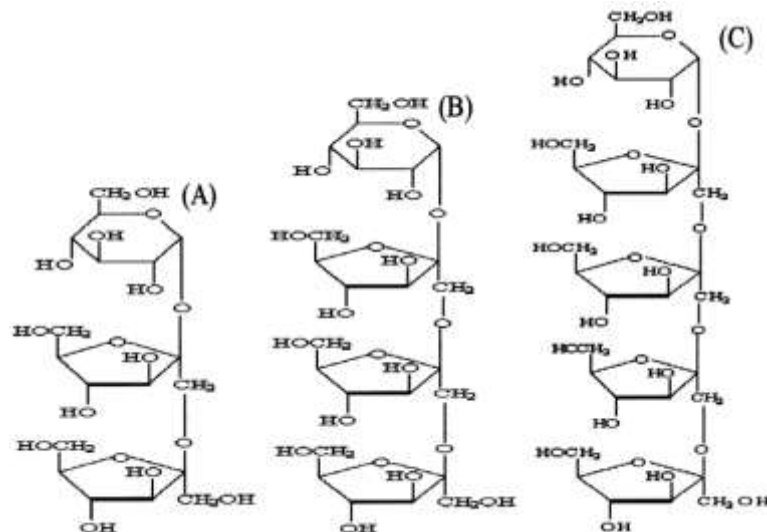


Figura 1: Estrutura química dos principais fruto-oligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil-nistose (C).

Fonte: PASSOS E PARK, 2003, p. 386

Como status legal, os FOS são considerados ingredientes e não aditivos alimentares na maioria dos países, inclusive no Brasil (ANVISA, 2016; PASSOS ; PARK, 2003). São fibras dietéticas, confirmado pelas autoridades legais em vários países e, nos Estados Unidos possuem o status GRAS (*Generally recognized as safe*) (PASSOS; PARK, 2003).

2.2.2 Características

Os FOS são altamente higroscópicos e sua retenção de água é superior à da sacarose e a mesma que do sorbitol. A viscosidade de uma solução de FOS é maior que a da sacarose na mesma concentração devido ao maior peso molecular. A elevada viscosidade pode retardar a taxa de esvaziamento gástrico e a digestão e absorção de nutrientes. Sua estabilidade térmica (até 130 °C) também é maior que a da sacarose e são muito estáveis no intervalo de pH 4,0-7,0 do alimento (BORNET *et al.*, 2002; MUSSATTO; MANCILHA, 2007; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009). É mais solúvel do que o açúcar (sua solubilidade em água atinge 80% à temperatura de 25 °C) e apresenta de 30 a 50% de seu poder adoçante (FRANCK, 2002).

Os FOS podem substituir a sacarose em muitas das suas propriedades, incluindo solubilidade, congelamento e ponto de fusão. Foi estimado que seu valor calórico é de 1,5 a 2,0 kcal/g, o que representa 40-50% daqueles dos carboidratos digeríveis tal como sacarose (MUSSATTO; MANCILHA, 2007; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009). Eles têm as seguintes propriedades:

- Sabor: o seu sabor doce é muito similar ao da sacarose, e assim são úteis para vários tipos de alimentos em que a utilização de sacarose é restrita (PASSOS; PARK, 2003; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009).
- Caloria livre: Isto é, no corpo humano faltam as enzimas necessárias para hidrolisar as ligações beta, contudo não são hidrolisados pelas enzimas digestivas. Assim, uma vez que estas substâncias não são utilizadas como fonte de energia no corpo tornam-se seguras para pessoas em dietas de emagrecimento (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009).
- Não cariogênicos: uma vez que não são utilizados pela microbiota oral para formar ácidos, que servem como matriz para a formação da placa e, em última análise, em cáries dentárias. Assim, o FOS é atualmente utilizado como substitutos do açúcar não cariogênicos em gomas de mascar, confeitaria, iogurtes e bebidas (RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009).
- O FOS comportam-se como fibra alimentar solúvel do ponto de vista fisiológico, uma vez que são carboidratos não digeríveis de origem vegetal, que atingem o

intestino grosso, onde podem ser fermentados por micro-organismos do cólon. A degradação bacteriana do FOS ocorre em duas etapas: na primeira fase, os monômeros são hidrolisados por beta-oxidases bacterianas. Na segunda, os monômeros liberados fermentam anaerobicamente para produzir AGCC tais como ácidos acético, propiônico, butírico e gases (H₂, CO₂, CH₄) (BORNET *et al.*, 2002; KELLY, 2009; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009).

2.2.3 Fontes e consumo

Os FOS são encontrados naturalmente em diversos alimentos de origem vegetal, tais como: alho, chicória, alcachofra, aspargo, cebola, trigo, banana, beterraba, mel, açúcar mascavo e batata *yacon* (BORNET *et al.*, 2002; GOTO *et al.*, 2014; PASSOS; PARK, 2003; ROBERFROID, 2007). No entanto, os níveis em que estão presentes nestes alimentos são demasiadamente baixos para exercer efeito significativo como prebiótico (LIMA, 2010).

Estima-se que na Holanda consuma-se entre 2 a 12 g de FOS por dia *per capita*. No Japão o consumo diário é estimado em 13,7 mg/kg/dia. Encontra-se neste país o maior mercado comercial de FOS, sendo que os oligossacarídeos são um dos produtos mais populares como alimentos funcionais (ROBERFROID, 2005). Não foram encontrados dados de consumo médio diário de FOS no Brasil e em outros países.

2.2.4 Síntese

Os FOS são produzidos em escala comercial por meio de duas técnicas, que resultam em dois produtos finais sutilmente diferentes. A primeira delas envolve a hidrólise enzimática parcial da inulina, resultando em uma mistura com grau de polimerização que varia de 2 a 7 com uma média de 4 unidades de frutossil. Este primeiro grupo consiste de unidades lineares de frutossil com ou sem uma unidade final de glicose. Após a purificação e evaporação do produto, obtém-se o xarope de oligofrutose. Para a produção de oligofrutose em pó, utiliza-se o processo de secagem por *spray dryer* (PASSOS; PARK, 2003; ROBERFROID, 1993).

O segundo grupo é preparado por reação enzimática de transfrutosilação em resíduos de sacarose, usando a enzima β -frutosidase do fungo *Aspergillus niger*.

Consiste tanto de cadeias lineares como de cadeias ramificadas de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutose com média de 3 unidades (BOUHNİK *et al.*, 1996; PASSOS; PARK, 2003; ROBERFROID, 2005).

2.2.5 Benefícios do FOS no trato gastrointestinal

Os possíveis benefícios dos FOS para a saúde humana têm sido estudados por mais de uma década. Alguns dos benefícios evidentes para a saúde do trato gastrointestinal incluem os seguintes:

2.2.5.1 Modulação da microbiota intestinal

A dieta e sua composição têm um grande impacto no intestino e na sua microbiota. Observou-se que qualquer tipo de alteração na dieta afeta o metabolismo da microbiota intestinal. As fibras dietéticas exercem um efeito combinado sobre o pH do intestinal e o metabolismo das bactérias (BELORKAR; GUPTA, 2016; CHEN *et al.*, 2000; FLINT; DUNCAN; SCOTT, 2007).

A fermentação de FOS no cólon tem uma série de consequências que afetam a fisiologia do intestino grosso. O primeiro benefício é a produção de AGCC que podem criar um ambiente mais ácido que seja benéfico para desenvolvimento de bactérias como Bifidobactérias ou Lactobacilos, mas é prejudicial ao crescimento de espécies patogênicas, como Clostrídios e *Escherichia coli* (FLORES-MALTOS *et al.*, 2016; RIVERO-URGELL; SANTAMARIA-ORLEANS, 2001; ROBERFROID, 2000).

Buddington e colaboradores (2002) administraram 4 g de FOS diariamente a 12 indivíduos saudáveis por 39 dias de um período de 42 dias de dieta controlada. A suplementação com FOS aumentou o total de micro-organismos anaeróbios e Bifidobactérias conforme avaliado pela cultura de fezes. As espécies de Enterobacteriaceae e Bifidobacteria não foram distinguidas (BUDDINGTON; DONAHO; BUDDINGTON, 2002).

Gibson e colaboradores (1995) relataram que o FOS aumentou a proporção de Bifidobactérias (avaliada por culturas de fezes) em adultos saudáveis durante duas semanas de suplementação de 15 g por dia em três doses divididas. Declínios significativos em Bacteroides, Clostridia e Fusobacteria também foram relatados após duas semanas de suplementação.

Bouhnik e colaboradores (1999) administraram FOS ou placebo a 20 voluntários saudáveis que foram observados durante três períodos consecutivos de 12 dias. Durante o período de ingestão de 12 dias, os indivíduos receberam 12,5g/dia de FOS ou sacarose como o placebo em três doses diárias. A ingestão de FOS aumentou a contagem de Bifidobactérias fecais e não teve efeito significativo sobre anaeróbios fecais totais, conforme avaliado pela cultura de fezes. Em outro trabalho realizado pelos mesmos autores em 2007, administrou-se FOS em 12 voluntários idosos (idade média de 69 anos) mantidos em uma dieta controlada e recebendo 8g de FOS diariamente em duas doses diárias. Após quatro semanas, as contagens de Bifidobactérias fecais aumentaram significativamente em comparação com o período de observação pré-intervenção, 4 semanas após a interrupção da suplementação de FOS, as contagens de Bifidobactérias fecais regressaram aos níveis iniciais, indicando que a suplementação não tinha efeito bifidogênico duradouro. A contagem total de anaeróbios não mudou com a suplementação com FOS, mas estatisticamente diminuiu após a descontinuação do FOS. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na contagem de Enterobacteriaceae fecal durante a suplementação com FOS ou após a descontinuação (BOUHNİK *et al.*, 1999, 2007).

Estudos *in vivo* e *in vitro* com *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *B. angulatum* revelaram um importante aumento de crescimento quando os FOS foram utilizados como fonte de carbono. Observou-se também que o consumo de FOS diminui as populações de *Clostridium* e reduz a produção de flatulências (CUMMINGS; CHRISTIE; COLE, 2001).

A dose mínima de prebióticos do tipo inulina e FOS para produzir um efeito bifidogênico parece ser de pelo menos 2,5 g por dia. A evidência atual sugere algum grau de dose-resposta até 10 g por dia. Embora não esteja claro se as doses diárias acima de 10 g promovem maior bifidogênese, elas parecem aumentar a incidência

de efeitos colaterais. Rivero-Urgell e Santamaria-Orleans (2001) relataram que a ingestão de FOS necessária para atuar como agentes biológicos é entre 2 e 10 g/dia em adultos. No entanto, Manning e Gibson (2004) consideraram que pelo menos 4 g/dia, mas preferencialmente 8 g/dia de FOS seriam necessários para elevar significativamente o número de bifidobactérias no intestino humano (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Vários pesquisadores acreditam que um fator potencialmente mais importante que influencia o crescimento de Bifidobactéria, bem como outros micro-organismos, é a presença inicial e contagens de micro-organismos intestinais específicos antes da suplementação. Embora seja necessária mais investigação nesta área, é pelo menos possível que, a fim de aumentar as quantidades de uma espécie específica de Bifidobactéria ou outras bactérias, essa espécie deva inicialmente estar presente (KELLY, 2008).

Nas últimas décadas, o efeito da microbiota intestinal na saúde tem sido um dos principais tópicos de pesquisa. O intestino contém mais de 500 diferentes tipos de bactérias, que contribuem para um número importante de funções biológicas (KELLY, 2008).

2.2.5.2 Trânsito intestinal

Embora algumas fibras proporcionem benefício de efeito laxante e/ou regularidade das fezes, nem todas as fibras apresentam esse efeito. As diretrizes das DRIs (*Dietary Reference Intakes*) citam alguns estudos que sugerem um efeito laxante para inulina e FOS mas segundo Mcrorie *et al.* (2016), essas fibras são facilmente fermentadas, não permanecem intactas e presentes em todo o intestino grosso e não têm capacidade significativa de retenção de água no intestino grosso. Por isso, de forma mecânica, não seria esperado que elas proporcionassem benefício de regularidade (MCRORIE; MCKEOWN, 2016).

Contrariamente, Meksawan e colaboradores (2014) afirmam que a suplementação de FOS ao nível de 20 g/d durante 30 dias poderia aumentar significativamente a frequência das fezes e acelerar o tempo de trânsito colônico em pacientes com diálise peritonial. Eles são metabolizados e produzem AGCC que

acidificam o conteúdo colônico e estimulam seletivamente o crescimento de bifidobactérias. A proliferação destas bactérias colônicas provoca um aumento da massa fecal e produz um efeito volumoso nas fezes. Esta propriedade benéfica ajuda modulando as funções intestinais e melhorando a frequência da defecação. Segundo eles, os FOS são bem tolerados, com apenas eventos adversos leves, como inchaço e flatulência. Ao contrário de outros laxantes, FOS podem ser facilmente incorporados em uma dieta comum como um ingrediente alimentar. Contudo, a ingestão superior a 30 g por dia geralmente desencadeia o início de um desconforto severo no indivíduo, sendo o ideal seguir as doses recomendadas de cerca de 10 g por dia por pessoa.

Em outro estudo com idosos constipados, a suplementação de cerca de 10 g de FOS por dia aumentou significativamente a massa fecal seca e estimulou a proliferação de bifidobactérias colônicas (YEN *et al.*, 2011).

A demonstração mais evidente de efeito laxante foi no estudo de dieta controlada que mostrou que 15 g de FOS aumentaram significativamente a produção de fezes de 136 para 154 g / d ($n = 8$). O aumento da produção fecal deve-se provavelmente ao aumento da biomassa. Juntamente com o aumento na excreção de matéria seca, houve um aumento significativo no nitrogênio fecal. Nesse estudo, a excreção adicional de 0,32 g N / d quando FOS foi adicionado à dieta foi equivalente a 5 g de sólidos bacterianos, equivalente a 20-25 g de fezes (GIBSON *et al.*, 1995).

2.2.5.3 Doenças intestinais

Diversos estudos avaliaram o uso dos FOS em doenças intestinais, esses estudos apresentam resultados divergentes, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeitos do uso do FOS em modelos animais

Modelo	Animal / dose da suplementação / duração da suplementação	Resultado	Referências
Mucosite	Ratos agouti / 3 e 6% da dieta , durante 10 dias	Não apresentou efeitos benéficos na mucosite.	(SMITH <i>et al.</i> , 2008)
Colite	Camundongos C57BL / 3 g /dia, durante 7 dias	Reduziu a atividade da doença no cólon distal, aumentou a profundidade da cripta e produziu uma recuperação mais rápida de danos	(WINKLER; BUTLER; SYMONDS, 2007)
Colite	Ratos / 1 g/dia , durante 14 dias	FOS reduziu a atividade inflamatória intestinal, diminuiu os danos na mucosa, diminuiu a MPO, e inibiu a perda de peso corporal	(CHERBUT; MICHEL, 2003)
Colite	Camundongos C57BL / 50 g/ kg de dieta 2 tipos de dieta: purificada e não purificada, durante 5 dias	FOS agravou sintomas da colite (diarreia e perda de peso) na dieta purificada. FOS melhorou a gravidade dos sintomas (sangramento fecal), na dieta não purificada.	(GOTO <i>et al.</i> , 2010)
Colite	Ratos HLA-B27/ 8 g /kg de peso durante 12 semanas	A colite foi significativamente reduzida, aumentou bifidobactérias, e diminuiu <i>Bacteroides-Prevotella-Porphyromonas</i> e os <i>clusters</i> de <i>Clostridium XI</i> e <i>XIVa</i>	(KOLEVA <i>et al.</i> , 2012)

Em humanos 15 g de FOS por dia melhorou a atividade da doença, aumentou as bifidobactérias intestinais, a função das células dendríticas, a produção de IL-10 e expressão de TLR em pacientes com doença de crohn ativa. Em pacientes com transtorno funcional do intestino, 5 g por dia de FOS melhorou a qualidade de vida e o conforto digestivo dos pacientes (LINDSAY; , K WHELAN, A J STAGG, P GOBIN, H O AL-HASSI, N RAYMENT, M A KAMM, S C KNIGHT, 2006; PAINEAU *et al.*, 2008).

2.2.5.4 Modulação imunológica

Os insumos dietéticos influenciam diretamente o sistema imunológico, fornecendo energia e nutrientes ao hospedeiro, além de provocar mudanças na população e características metabólicas das bactérias do trato gastrointestinal (BUDDINGTON; DONAHOO; BUDDINGTON, 2002).

O mecanismo para o efeito benéfico dos prebióticos sobre a função imune no intestino ainda não é bem estabelecido. No entanto, foram propostos alguns eventos

celulares possíveis: (1) As fibras prebióticas são capazes de regular as enzimas lipogênicas hepáticas, por meio do aumento da produção de AGCC como o propionato (2) Produção de AGCC a partir de fermentação de fibras (especialmente butirato), modulando a acetilação da histona e, conseqüentemente, aumentando a acessibilidade de muitos genes para fatores transcripcionais (3) Modulação da produção de mucina (4) FOS e alguns outros prebióticos mostraram aumento de linfócitos e/ou número de leucócitos nos tecidos linfóides (GALT) e sangue periférico associado ao intestino (5) Estímulo da função fagocitária dos macrófagos intraperitoneais, através da secreção de IgA aumentada pelo GALT (PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015)

Estudos com FOS demonstraram IgA fecal aumentada em murinos (VELEZ *et al.*, 2013; WILSON; WHELAN, 2017), além da estimulação de imunoglobulina, a produção IL-1 β por macrófagos peritoneais foi suprimida em murinos alimentados com FOS, a IL-1 β é uma das primeiras citocinas liberadas após a estimulação dos macrófagos, tendo geralmente um efeito inflamatório (WILSON; WHELAN, 2017).

Os prebióticos também podem ter funções imunomoduladoras indiretas através das suas ações em células não imunes, tais como células epiteliais. No entanto, eles também podem exercer efeitos independentes do sistema imunológico, como estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias intestinais benéficas, conforme já citado anteriormente. Essas bactérias fornecem ao hospedeiro nutrientes essenciais, metabolizam compostos indigeríveis, defendem-se contra a colonização de patógenos oportunistas, e contribuem para o desenvolvimento da arquitetura intestinal, além de estimular o sistema imunológico. Na verdade, a homeostase imune metabólica e intestinal em mamíferos é, em grande parte mantida através de interações entre a microbiota intestinal e o GALT. O hospedeiro envolve ativamente a microbiota intestinal e controla a sua composição secretando peptídeos antimicrobianos e imunoglobulinas. Por outro lado, bactérias comensais moldam o sistema imunitário associado ao intestino, controlando a prevalência de populações distintas de células T (COLLINS; REID, 2016; FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015; IVANOV; HONDA, 2012; MAZMANIAN *et al.*, 2005).

Outras vias indiretas pelas quais os FOS exercem efeitos imunomoduladores incluem a produção de AGCC. O aumento de AGCC antagoniza o crescimento de

algumas cepas patogênicas bacterianas e favorece a produção de mucina no cólon. O AGCC butirato pode reduzir a produção de IFN- γ , IL-12, TNF- α e TGF- β 1 e elevar a liberação de IL-4 e IL-10 a partir de células mononucleares de sangue periférico estimuladas por lipopolissacarídeo. A IL-10 atua como um mediador abrangente de efeitos anti-inflamatórios em uma gama de citocinas. Sabe-se que as dextrinas solúveis podem reduzir as citocinas pró-inflamatórias, mesmo na ausência de IL-10, no entanto, na maioria dos casos, a IL-10 encontra-se elevada após a administração prebiótica (BARCELO *et al.*, 2000; BLAUT, 2002; FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015; OUWEHAND *et al.*, 2005).

Os AGCC também se ligam a receptores nas células imune, ativando os receptores acoplados à proteína G (GPR), tais como GPR41 e GPR43. Esta ligação afeta o recrutamento de leucócitos para locais inflamatórios, e suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. O GPR43 é altamente expresso em células polimorfonucleares (PMNs, isto é, neutrófilos) e é pouco expresso em células mononucleares de sangue periférico e monócitos purificados. Por outro lado, GPR41 é expresso em células mononucleares de sangue periférico mas não em PMN, monócitos, ou células dendríticas do intestino (BINDER; MEHTA, 1989; COVINGTON *et al.*, 2006; FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015; MASLOWSKI *et al.*, 2009; VINOLO *et al.*, 2009, 2011).

Além dos efeitos indiretos dos FOS e seus produtos de fermentação na microbiota, os efeitos diretos dos frutanos em geral sobre a sinalização das células imunes ganharam atenção como uma via adicional de imunomodulação (FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015; VOGT *et al.*, 2015). Trinta e seis estudos relatam os resultados do uso de frutanos na resposta imune realizados em ratos, porcos, cães e seres humanos, estes relatórios mostram que os frutanos podem ter efeitos específicos sobre diferentes componentes do sistema imunitário (FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015). Uma mistura diária oligofrutose/inulina (8 g) administrado por três semanas a idosos, reduziu a IL-6 produzida por células mononucleares de sangue periférico e melhorou as contagens de células T (COLLINS; REID, 2016).

Velez e colaboradores (2013) mostraram que a farinha de *yacon* (rica em FOS), quando administrada durante 30 dias, aumenta o número de bifidobactérias e lactobacilos no intestino grosso e tem efeitos intestinais imunomoduladores em

modelo experimental de infecção entérica em camundongos. A administração da farinha provocou um aumento de células produtoras de IgA, ativou células T e aumentou a expressão dos receptores CD206 e TLR4. A administração de *yacon* mostrou a capacidade de manter a homeostase intestinal sem induzir respostas inflamatórias.

2.2.5.5 Produção de ácidos graxos de cadeia curta

Os FOS são resistentes à digestão pelo organismo humano porque no TGI não há enzimas para hidrolisar as ligações com configuração β presente entre seus monômeros (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). Contudo, algumas bactérias do intestino grosso expressam hidrolases específicas para romper aquele tipo de ligação, sendo capazes de converter esses compostos em AGCC, tais como ácido acético, ácido butírico e ácido propiônico (BHOMIG *et al.*, 1999; MILLARD *et al.*, 2002), sendo que a nomenclatura mais utilizada na literatura é na forma de seus sais: acetato, butirato e propionato.

Os AGCC podem ser utilizados pelo organismo hospedeiro para diversas finalidades e geralmente estão ligados aos benefícios à saúde como: proliferação da mucosa, controles da inflamação, da carcinogênese, da absorção mineral e eliminação de compostos nitrogenados, além de gases (H_2 , CO_2 , CH_4), por meio do processo de fermentação (DELZENNE, 2003; FLORES-MALTOS *et al.*, 2016; RIVIERE *et al.*, 2016; SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., 2009). A fermentação envolve uma variedade de reações e processos metabólicos para degradação microbiana anaeróbia de matéria orgânica e, por meio da mesma, além dos produtos finais já mencionados, também é produzida a energia metabolizável necessária para a manutenção e crescimento de tais bactérias (WONG *et al.*, 2006). Com outros produtos fermentáveis, como celulose, pectina ou lactulose, a fermentação do FOS produz percentagens mais elevadas de ácido propiônico e butírico (BORNET *et al.*, 2002).

Todos os AGCC são absorvidos rapidamente no intestino grosso (90 a 95%), e são metabolizados pelos diferentes tecidos: butirato pelo epitélio colônico, propionato e acetato (em parte) por fígado e acetato (em parte) pelo músculo e

outros tecidos periféricos (BORNET *et al.*, 2002; CHERBUT; MICHEL, 2003; CUMMINGS; CHRISTIE; COLE, 2001).

A dependência do cólon em relação à oxidação dos AGCC aumenta do cecum para o reto, podendo ser importante na patogênese de colites. O acetato e o propionato são menos avidamente metabolizados, localmente, sendo transportados ao fígado (OLIVEIRA, 2011).

Os AGCC exercem efeitos tróficos sobre o intestino grosso, por meio do contato direto dos ácidos com a mucosa colônica. Esse trofismo ocorre de maneira transmural, devendo-se não somente ao aumento da área de superfície e da proliferação celular da mucosa, mas também, ao estímulo na síntese de DNA, RNA e proteínas. Os mecanismos de trofismo colônico ocorrem por aumento na oxigenação energética, estímulo do fluxo na microcirculação sanguínea por dilatação das artérias de resistência, produção de hormônios enterotróficos e estímulo do sistema nervoso entérico. O aumento do fluxo sanguíneo na parede do cólon atrófico facilita e promove o crescimento em todas as camadas da parede intestinal (OLIVEIRA, 2011; VINOLO, 2010). Também modulam a expressão de genes (OGAWA *et al.*, 2003; WEBER; KERR, 2006) ativação de fatores de transcrição (SEGAIN, 2000; VINOLO, 2010), diferenciação, maturação e ativação de células (BHOMIG *et al.*, 1999; MILLARD *et al.*, 2002). Esses compostos modulam diferentes aspectos da fisiologia gastrointestinal como a liberação de hormônios (peptídeo Y) (SAMUEL *et al.*, 2008) e absorção de eletrólitos e água. Outros processos como adipogênese/lipólise e a resposta imune/inflamatória também são alvo da ação dos AGCC (GE *et al.*, 2008; VINOLO, 2010).

2.2.5.5.1 Butirato

O butirato tem sido reconhecido como a principal fonte de energia para a mucosa colônica, atuando na proliferação e na regulação da diferenciação e da apoptose dos colonócitos (BORNET *et al.*, 2002; JOHNSON, 2002; PRYDE *et al.*, 2002; SMITH; YOKOYAMA; GERMAN, 1998). O butirato é o AGCC mais estudado (VINOLO, 2010).

Um estudo mostrou que o butirato poderia suprimir a expressão do fator de transcrição NF- κ B em linhas celulares HT-29 (MACFARLANE; STEED;

MACFARLANE, 2008). Além disso, exerce uma atividade antiproliferativa em muitos tipos de células. O butirato foi identificado como potencial agente antineoplásico no cólon (SCHARLAU *et al.*, 2009), demonstrou induzir a apoptose em células de câncer gástrico (MATTHEWS; HOWARTH; BUTLER, 2012) e também desempenha um papel essencial na regeneração da mucosa (POOL-ZOBEL; SAUER, 2007). Há diversas evidências sobre os seus efeitos preventivos no desenvolvimento de adenoma. Segundo Smith e colaboradores (1998) e Matthews e colaboradores (2012), o butirato auxilia na indução da expressão gênica, bem como influencia na taxa de expressão gênica por meio de seus efeitos nas modificações translacionais. As principais modificações são nucleares: acetilação de histona e fosforilação que afetam a estrutura da cromatina celular assim como modificações na ligação ao receptor hormonal.

Assim, pode ser vantajoso fornecer hidratos de carbono indigeríveis como fonte indireta de butirato para o intestino. Campbell e colaboradores (1997) avaliaram, em ratos, os efeitos de oligossacarídeos selecionados na concentração de AGCC, pH total do intestino grosso e concentrações de microbiota. A duração do estudo foi de 14 dias. A dieta contendo FOS resultou em maior quantidade de butirato cecal comparativamente com o controle, celulose ou xilo-oligossacarídeo na dieta.

Esse AGCC altera a produção e liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, regula o processo de apoptose e diferenciação, maturação e função de leucócitos, particularmente, dos monócitos / macrófagos. Além disso, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-12) e óxido nítrico e aumentam a liberação de IL-10 por macrófagos (PARK *et al.*, 2007; SÄEMANN *et al.*, 2000). Um dos mecanismos envolvidos nessas ações parece ser a inibição da ativação do fator de transcrição NF κ B (PARK *et al.*, 2007; VINOLO, 2010).

2.2.5.5.2 Propionato

O propionato é substrato para gliconeogênese hepática. Tem sido também, relacionado à inibição da síntese de colesterol no tecido hepático. Assim, o efeito das fibras na redução do colesterol pode ser secundário à produção de propionato no cólon (OLIVEIRA, 2011).

Apenas 10% do propionato absorvido permanecem na corrente sanguínea após a passagem pelo fígado. Neste órgão, esse AGCC é metabolizado e pode ser utilizado como substrato, via formação de piruvato, da gliconeogênese. Pode ser formado no catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada e metionina, sendo que sua concentração plasmática pode estar aumentada em condições nas quais há aumento das taxas de oxidação de aminoácidos. Além disso, o propionato inibe a formação de ureia no fígado (OLIVEIRA, 2011; VINOLO, 2010).

Segundo Macfarlane *et al.* (2008) e Nurmi *et al.* (2005), o propionato também exerce um efeito anti-inflamatório em relação às células de câncer de cólon.

2.2.5.5.3 Acetato

O acetato, AGCC mais abundante, é pouco metabolizado no cólon devido em parte ao fato de ser rapidamente absorvido e transportado para o fígado. Após absorção, aproximadamente 75% do acetato é captado e metabolizado no fígado, onde pode ser utilizado por diversas vias: síntese de ácidos graxos de cadeia longa (lipogênese), síntese de corpos cetônicos (cetogênese), produção de colesterol (fonte primária para a síntese de colesterol), glutamina e glutamato. O restante do acetato que atinge a circulação é rapidamente captado e oxidado por vários tecidos como músculo e glândulas mamárias (COOK; SELLIN, 1998; VINOLO, 2010).

Tabela 2- Resumo dos efeitos fisiológicos dos AGCC

Butirato	<p>Efeitos intestinais</p> <ul style="list-style-type: none"> • é a fonte de energia preferida para as células epiteliais do cólon • diminui o pH do cólon (que diminui a solubilidade do sal biliar e aumenta a absorção de minerais) • diminui a absorção de amônia e inibe o crescimento de patógenos • estimula a proliferação de células epiteliais de cólon (normais) • evita a proliferação e induz a apoptose de células de câncer colorretal • afeta a expressão gênica de células epiteliais de cólon • desempenha um papel protetor contra câncer de cólon e colite • melhora a função de barreira intestinal por estimulação da formação de mucina, peptídeos antimicrobianos, e proteínas de junção firme • modula o sistema imunológico • tem efeitos anti-inflamatórios • estimula a absorção de água e sódio • reduz o estresse oxidativo no cólon
Propionato	<p>Efeitos intestinais</p> <ul style="list-style-type: none"> • é uma fonte de energia para as células epiteliais do cólon (menor que o butirato) • diminui o pH do cólon (aumenta a absorção de minerais, diminui a absorção de amoníaco, e inibe o crescimento de agentes patogênicos) • previne a proliferação e induz a apoptose das células cancerosas colorretais • modula o sistema imunitário • possui efeitos anti-inflamatórios <p>Outros efeitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • promove a saciedade • reduz os níveis de colesterol no sangue • diminui a lipogênese do fígado • melhora a sensibilidade à insulina
Acetato	<p>Efeitos intestinais</p> <ul style="list-style-type: none"> • é uma fonte de energia para as células epiteliais do cólon (menor que o butirato) • diminui o pH do cólon (aumenta a absorção de minerais, diminui a absorção de amoníaco, e inibe o crescimento de agentes patogênicos) • tem efeitos anti-inflamatórios • aumenta o fluxo sanguíneo colônico e a absorção de oxigênio • usado como co-substrato para produzir butirato <p>Outros efeitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • substrato para a biossíntese de colesterol e ácidos graxos no fígado

Fontes: AL-LAHHAM *et al.*, 2010; CHANG *et al.*, 2013; HAMAKER; TUNCIL, 2014; HAMER *et al.*, 2008; LOUIS; HOLD; FLINT, 2014; MACFARLANE; MACFARLANE, 2012; RIVIERE *et al.*, 2016; TRALONGO *et al.*, 2014.

2.3 Barreira intestinal

O epitélio intestinal fornece uma barreira física que separa os trilhões de bactérias comensais no lúmen intestinal da lâmina própria (LP) subjacente e das camadas intestinais mais profundas. As células M, células B (especialmente as células plasmáticas produtoras de IgA), células T, macrófagos e células dendríticas estão localizadas diretamente abaixo do epitélio intestinal (FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015).

A camada de muco possui propriedades hidrofóbicas e surfactantes. Esta camada contribui para a retenção das secreções da mucosa que são ricas em peptídeos antibacterianos e IgA. O muco fornece proteção contra os microorganismos luminiais, como as bactérias, destruindo-as e prevenindo a sua adesão à mucosa e ao epitélio intestinal. Além disso, o peristaltismo intestinal também é um fator essencial que ajuda na função de proteção da barreira intestinal (TURNER, 2009).

A microbiota intestinal e o muco formam a chamada barreira mucosa, um importante sistema de defesa contra fatores potencialmente patogênicos e imunogênicos presentes no lúmen. De fato, a membrana mucosa separa o lúmen contendo a microbiota, resíduos de alimentos orgânicos e secreções (salivares, gástricas, biliares, pancreáticas e intestinais) do GALT. As células que compõem o sistema imunológico estão concentradas principalmente nos órgãos linfáticos localizados na lâmina própria do TGI. O GALT é composto por várias estruturas foliculares, placas de Peyer e agregados de linfócitos T (PETERSON; ARTIS, 2014).

Abaixo da camada mucosa, as células epiteliais intestinais formam uma barreira física contínua. As junções firmes conectam as células epiteliais intestinais adjacentes e estão associadas à rede de actina e miosina que regulam a permeabilidade intestinal. O epitélio intestinal é continuamente renovado por células intestinais epiteliais pluripotentes que residem na base das criptas, onde a proliferação, a diferenciação e o potencial funcional de progenitores de células epiteliais é regulada pelas células estaminais locais (CROSNIER; STAMATAKI; LEWIS, 2006; PETERSON; ARTIS, 2014; VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009).

Embora a maioria das células próximas ao lúmen intestinal sejam enterócitos absorptivos (adaptados para a função metabólica e digestiva), as células epiteliais intestinais secretoras, incluindo as células enteroendócrinas, as células caliciformes

e as células Paneth, são especializadas para manter a função digestiva e barreira do epitélio. As células enteroendócrinas representam uma ligação entre os sistemas neuroendócrino central e entérico através da secreção de numerosos reguladores hormonais da função digestiva. A secreção luminal de mucinas e proteínas antimicrobianas (AMPs) por células caliciformes e células de Paneth, respectivamente, estabelecem uma barreira física e bioquímica ao contato microbiano com a superfície epitelial e as células imunológicas subjacentes. Coletivamente, as diversas funções das células epiteliais intestinais resultam em uma barreira dinâmica ao meio ambiente, que protege o hospedeiro de infecção e exposição contínua a estímulos potencialmente inflamatórios (JOHANSSON *et al.*, 2010; KIM; HO, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014) .

A função de barreira ou permeabilidade intestinal é um evento dinâmico e, funcionalmente, responde a vários estímulos fisiológicos, patológicos e farmacológicos. Em condições fisiológicas normais, o espaço paracelular deve formar rigorosa barreira seletiva e semipermeável. Esta seletividade é proporcionada pelas junções firmes e é formada por um complexo de multiproteínas transmembranares, dentre elas ocludina, claudinas, molécula de adesão e proteínas acessórias ZO. Portanto, as células epiteliais se ligam e regulam a circulação dos antígenos e substâncias via paracelular e intercelular (figura 2) (ANDRADE *et al.*, 2015c; RAO; SAMAK, 2013).

No contexto das doenças inflamatórias intestinais, a desregulação das interações na barreira, mediada pela sinalização do fator de necrose tumoral leva a rearranjos do citoesqueleto das células epiteliais intestinais que rompem as junções apertadas e aumentam a permeabilidade (figura 2) (BLAIR *et al.*, 2006; MARCHIANDO *et al.*, 2010; PETERSON; ARTIS, 2014).

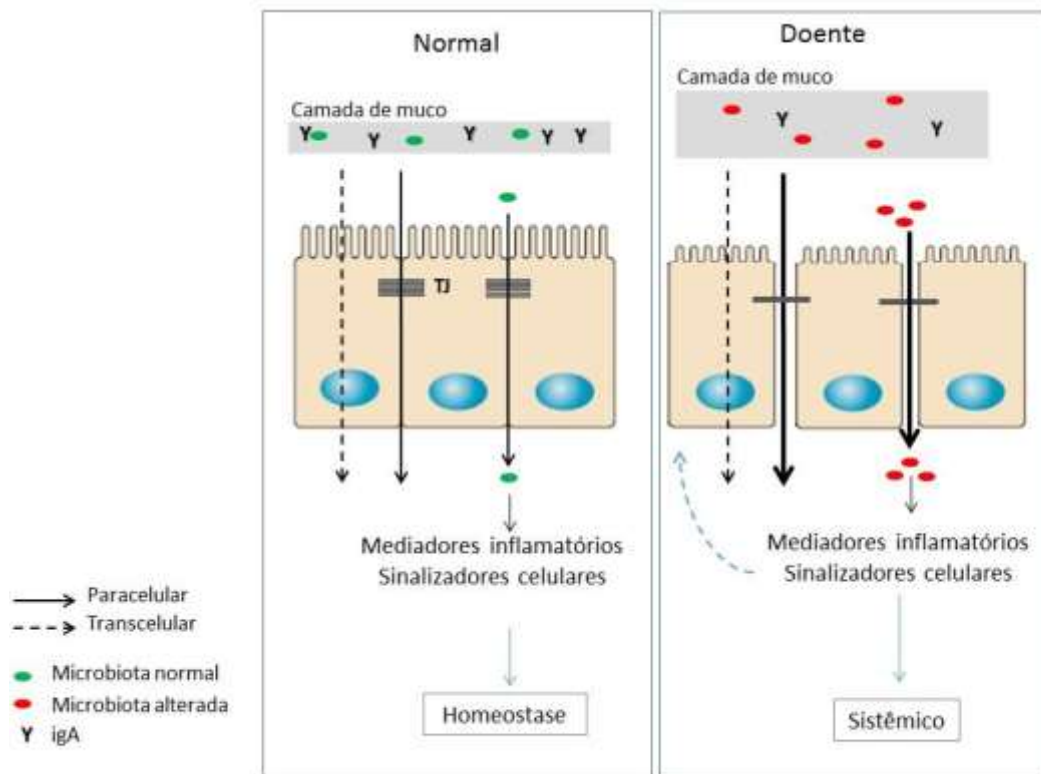


Figura 2: Epitélio intestinal normal e doente

Fonte: Adaptado de Andrade *et al.* (2015a), p 1081.

A permeabilidade intestinal (PI) consiste na passagem, por via paracelular, de moléculas do lúmen intestinal para o sangue por mecanismo de difusão não mediada (STENMAN; HOLMA; KORPELA, 2012). Trata-se de processo fisiológico regulado pelas junções firmes, as quais mantêm a união entre os enterócitos e regulam o fluxo de moléculas pela via paracelular, ou seja, entre as células (PUROHIT *et al.*, 2008) (figura 2). Enterócitos secretam mediadores imunológicos para reagir com antígenos, tais como peptídeos antibacterianos, imunoglobulina A secretora (sIgA) e quimiocinas. Citocinas, tais como as pró-inflamatórias interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), bem como interleucinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, são também produzidas como mediadores imunológicos em resposta a lesões (THORPE; STRINGER; BUTLER, 2013). O NF- κ B é um mensageiro de sinalização que regula a atividade de citocinas e outras defesas biológicas, sua ativação é estimulada por bactérias, vírus, citocinas e

estresse oxidativo, como bem como radiação ionizante e agentes quimioterapêuticos (LOGAN *et al.*, 2009; STRINGER *et al.*, 2013; YEOH *et al.*, 2005). Devido aos seus diferentes genes alvo, o NF-κB tem sido associado a patogênese de várias doenças (ANDRADE *et al.*, 2015a). Já a permeabilidade transcelular está associada com o movimento de antígenos e moléculas do lúmen para a mucosa através de células epiteliais intestinais. Enterócitos e outras células especializadas secretam mucinas que criam a camada de muco. Células epiteliais do intestino secretam IgA na homeostase, mas quando ocorre uma lesão, esta produção é alterada (ANDRADE *et al.*, 2015c) (figura 2).

A quimioterapia é dos fatores que pode aumentar a PI, resultando em apoptose celular e, também, em atrofia das vilosidades (TOUCHEFEU *et al.*, 2014). O aumento da permeabilidade em consequência do uso de quimioterápicos já foi descrito em trabalhos clínicos (BARROS, 2016; GENEROSO *et al.*, 2015; LEOCÁDIO, 2013; MAIOLI *et al.*, 2014).

2.4 Quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU)

O 5-fluorouracil é uma pirimidina fluorada, preparada a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor, na posição cinco da molécula de uracil (Figura 3). O sítio de substituição no anel pirimidina foi selecionado para inibir a conversão do nucleotídeo uracil em timidina (PINEDO; PETERS, 1988).

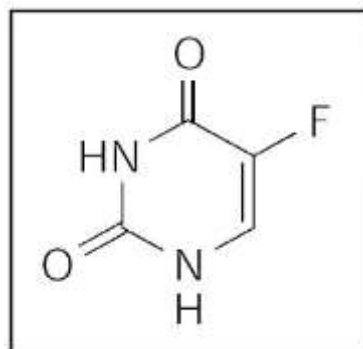


Figura 3. Estrutura química do 5-FU

Fonte: LONGLEY *et al.*, 2003, p.332

O 5-FU é um antimetabólito do análogo de pirimidina, com um amplo espectro de atividade contra tumores sólidos (trato gastrointestinal, pâncreas, ovário, fígado,

cérebro, mama, etc), isolado ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos, é um dos pilares da quimioterapia (ALA *et al.*, 2016). Desenvolvido na década de 1950 e intensivamente estudado, o 5-FU atua causando dano epitelial na mucosa do TGI alterando sua morfologia com aumento da infiltração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, bem como aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e efeitos colaterais adversos (SOARES *et al.*, 2008).

Esse anti-metabólito é um dos agentes quimioterapêuticos mais utilizados na oncologia, tem sido considerado o medicamento padrão para o tratamento do câncer de colorretal metastático, podendo ser utilizado como primeira ou segunda linha de tratamento (DOUILLARD *et al.*, 2000). Tem a capacidade de exercer efeitos citotóxicos através da sua incorporação em RNA e DNA e finalmente inibir a síntese de DNA, melhorando as estatísticas e taxas de sobrevivência. Dentro das células o 5-FU é convertido em três metabólitos ativos principais que causam esse dano ao RNA e/ou DNA ou que irão agir sobre a enzima timidilato sintase. Dentre os metabólitos estão: fluorodeoxiuridinamono-fosfato (FdUMP), que atua inibindo a ação da timidilato sintase (MCCARTHY *et al.*, 1998), fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP), que age sobre a síntese de DNA e fluorouridina trifosfato (FUTP), que age sobre a síntese de RNA e interfere na função celular (LI *et al.*, 2009; LONGLEY; G., 2003). Além disso, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e citocinas pró inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-2, TNF- α , são geradas indiretamente e amplificam ainda mais os danos causados por esse quimioterápico (ABDELOUHAB *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012). A reação limitante no catabolismo do 5-FU é catalisada pela enzima diidropirimidinas desidrogenase (DPD), que converte 5-FU em diidrofluorouracil (DHFU) (LI *et al.*, 2009; LONGLEY; G., 2003).

As células com alto índice mitótico são as mais afetadas pelo 5-FU, e por isso, as células da medula óssea e do trato gastrointestinal são muito susceptíveis (ANTUNIASSI, 2005; PINEDO; PETERS, 1988). Mais de 80% do 5-FU administrado é catabolizado no fígado onde a diidropirimidinas desidrogenase (DPD) é abundantemente expressa, podendo ainda ser metabolizado na mucosa intestinal, nas células tumorais e em outros tecidos (LI *et al.*, 2009; LONGLEY; G., 2003).

Estudos estimam que 50% a 80% dos pacientes submetidos a quimioterapia 5-FU desenvolvem mucosite intestinal. A mucosite intestinal é o efeito adverso

limitante da dose da terapêutica com 5-FU e pode ser acompanhada por uma má adesão ao tratamento (ALA *et al.*, 2016; AZEVEDO *et al.*, 2012).

2.5 Mucosite intestinal

A mucosite é um problema oncológico associado à citotoxicidade da quimioterapia e da radioterapia. É caracterizada por ulceração e inflamação da mucosa com sintomas clínicos incluindo dor intensa, sangramento retal, inchaço, náuseas, vômitos e diarreia. Em casos graves, a mucosite pode também limitar a dose do quimioterápico e retardar o tratamento programado, comprometendo assim a eficácia, resultando em maior taxa de mortalidade em pacientes com câncer (AZEVEDO *et al.*, 2012; BOWEN; GIBSON; KEEFE, 2011; ELTING *et al.*, 2003; MASHTOUB *et al.*, 2016).

A incidência e a gravidade da mucosite intestinal são dependentes do tipo de tratamento utilizado (combinação de radioterapia e quimioterapia, dosagem, duração e sequência) (DUNCAN; GRANT, 2003). No tratamento de câncer colorretal metastático, os tratamentos de primeira linha geralmente incluem fluoropirimidinas (5-FU ou capecitabina) juntamente com leucovorina e oxaliplatina (FOLFOX e FLOX) ou irinotecano (FOLFIRI e IFL). Tanto o 5-FU como o irinotecano podem afetar a mucosa intestinal, levando à vacuolização epitelial, apoptose de criptas e hipersecreção de mucina acompanhada por volume aumentado de fluido no intestino delgado e diarreia notável (ELTING *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2016; SOARES *et al.*, 2013).

Conforme foi relatado, mais de 50% dos pacientes que recebem a quimioterapia com o fármaco 5-FU desenvolvem mucosite oral ou intestinal (TANG *et al.*, 2017). Contudo, a ausência de critérios uniformes de pontuação, a variabilidade dos limiares de notificação, diferenças no desafio biológico (variações nos regimes de tratamento com quimio e radioterapia), campos de radiação e localização do tumor resultaram em relatos inconsistentes de incidência. Além disso, há uma desconexão entre os profissionais de saúde e os pacientes em relação às suas avaliações da presença, gravidade e efeito da mucosite. A taxa, a severidade dos sintomas e a influência da mucosite na qualidade de vida é rotineiramente

percebida como sendo maior entre os pacientes do que a literatura médica sugere (SONIS, 2013).

Clinicamente, a mucosite está associada à bacteremia, desnutrição, uso de nutrição parenteral total e aumento no uso de analgésicos intravenosos. Todas essas complicações levam a hospitalizações mais prolongadas e ao aumento dos custos dos cuidados de saúde (VAN VLIET *et al.*, 2010).

A lesão da barreira mucosa do intestino é um dos efeitos secundários mais debilitantes de tratamento com quimioterápicos. Esta complicação resulta da proliferação reduzida enterócitos e migração e, também, aumento da apoptose celular, que se combinam para interromper a função de barreira intestinal normal. A destruição da mucosa intestinal provoca redução na absorção de nutrientes e aumento da vulnerabilidade a infecções (DUNCAN; GRANT, 2003; TANG *et al.*, 2017). O uso do 5-FU também está associado com a infiltração de neutrófilos, o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e esvaziamento gástrico retardado (SOARES *et al.*, 2013).

Segundo Sonis (2004), cinco fases são importantes na fisiopatologia da mucosite (figura 4):

(1) a formação de espécies reativas de oxigênio levando à ativação do NF- κ B durante a fase de iniciação;

NF- κ B é citado como diretamente responsável pela regulação positiva das citocinas pró-inflamatórias tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6 (LOGAN *et al.*, 2009). Estas citocinas amplificam os danos nas células da mucosa na fase 2 descrita abaixo. Chang e colaboradores (2012) sugerem que NF- κ B é a principal molécula envolvida na mucosite induzida por 5-FU, e observaram que a inibição da atividade de NF- κ B promove supressão da inflamação e melhora do dano à mucosa.

(2) geração de moléculas mensageiras causando a morte celular. Os radicais livres ativam os segundos mensageiros que transmitem sinais dos receptores na superfície celular para o interior da célula. Isto leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, lesão tecidual e morte celular.

(3) a amplificação de moléculas mensageiras, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α), resultando em inflamação e apoptose tecidual.

As citocinas inflamatórias produzidas são as principais substâncias envolvidas na amplificação dos sinais por influenciarem a síntese e a ação de outras citocinas (SCULLY; EPSTEIN; SONIS, 2004; SONIS *et al.*, 2004). Durante a amplificação, observa-se a ativação de outros fatores de transcrição, como p53 e p21, e de proteases, como a caspase 3. Todos esses componentes estão envolvidos na ativação e no processo de morte celular programada ou apoptose (KEEFE; GIBSON; HAUER-JENSEN, 2004; SCULLY; EPSTEIN; SONIS, 2004).

(4) descontinuidade da barreira epitelial resultante da apoptose durante a fase ulcerativa com importante infiltrado de células inflamatórias promovendo, assim, translocação bacteriana (SONIS, 2004).

É nesta fase que a mucosite fica mais evidente, denominada " fase de ulceração e inflamação". A permeabilidade intestinal é aumentada, permitindo a translocação de bactérias para a corrente sanguínea. Isto é acompanhado por dor e desconforto severos, e às vezes complicações secundárias, como desnutrição e septicemia (LOGAN *et al.*, 2007). Outras alterações ocorrem durante a fase ulcerativa, incluindo a ablação da cripta e atrofia das vilosidades, levando a uma diminuição da área absorptiva global do intestino, diminuição das enzimas e também alterações na microbiota intestinal (LOGAN *et al.*, 2009)

(5) uma fase de cura espontânea, caracterizada pela proliferação de células.

Seguindo a descontinuação de quimioterapia ou radioterapia, começa a resolução de sintomas e reparação da mucosa. É caracterizada pela proliferação e diferenciação de tecidos e células (LALLA; SONIS; PETERSON, 2008). A fase final de cura ocorre dentro de aproximadamente duas semanas após a interrupção do tratamento, sendo um processo espontâneo de auto recuperação, onde o epitélio intestinal é renovado para reparar a destruição da mucosa e estabelecer a microbiota (LIU *et al.*, 2009)

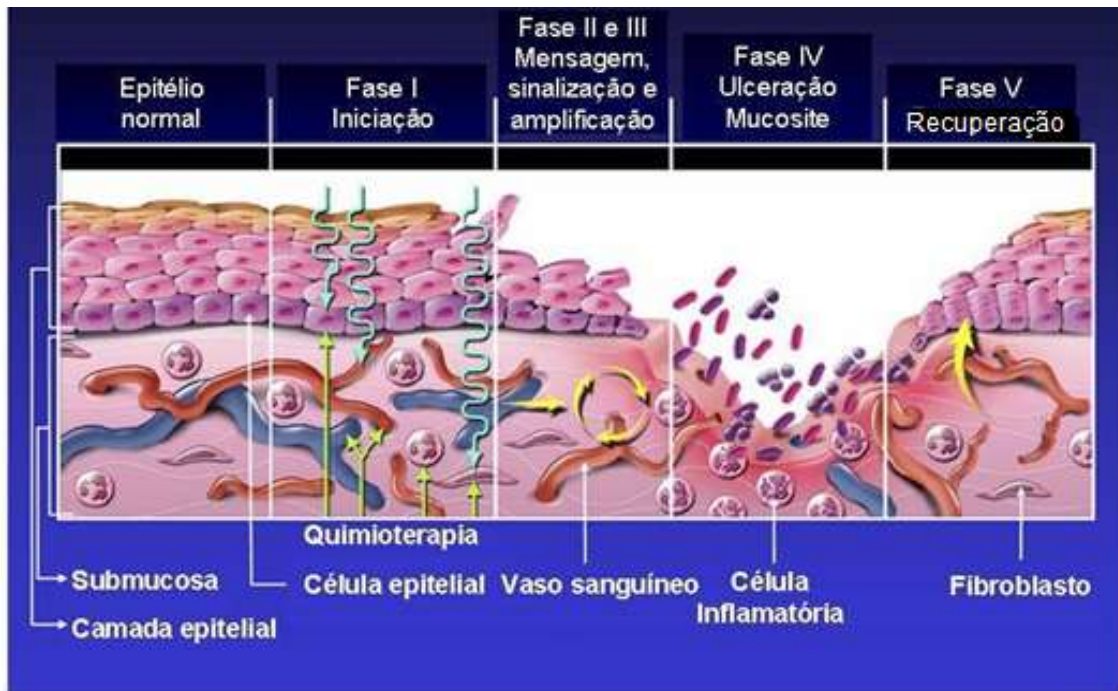


Figura 4. Modelo fisiopatológico da mucosite em cinco fases, do surgimento da doença à recuperação do tecido.

FONTE: adaptado de Sonis, 2004, p. 278-280

Os quimioterápicos também têm efeitos prejudiciais na composição da microbiota intestinal e estes estão sendo cada vez mais estudados (MAYNARD et al., 2012). Uma mudança na predominância de bactérias gram-positivas para as bactérias gram-negativas foi observada após a administração de 5-FU em ratos (TANG et al., 2017). Em outro estudo, o tratamento com 5-FU e Irinotecano elevou a quantidade de *Clostridium* XI cluster e *Enterobacteriaceae* (LIN et al., 2012). O crescimento destas bactérias pode levar à formação de metabólitos tóxicos ativos do quimioterápico, o que afeta diretamente a progressão da mucosite intestinal (TANG et al., 2017).

As bactérias comensais têm um papel essencial nos sistemas imune inato e adaptativo do hospedeiro (MAYNARD et al., 2012), sendo que a disbiose intestinal contribui grandemente para o desenvolvimento de mucosite induzida por quimioterapia (VAN VLIET et al., 2010). Com isso, manter uma microbiota saudável e camada de mucina durante tratamento de quimioterapia poderia minimizar a probabilidade de translocação bacteriana e infecção por mucosite (LOGAN et al., 2009; TANG et al., 2017). Portanto, a normalização da homeostase intestinal pode ser uma estratégia adequada para melhorar o estado dos pacientes que recebem

este tipo de tratamento (TANG *et al.*, 2017). Estudos demonstram a diminuição do número de células caliciformes e secreção de mucina associada à administração de quimioterapia (LOGAN *et al.*, 2009),

São descritas cinco maneiras possíveis pelas quais as bactérias intestinais podem atenuar ou agravar a mucosite:

- 1) influenciando o processo inflamatório
- 2) influenciando a permeabilidade intestinal;
- 3) influenciando a composição da camada de muco;
- 4) influenciando a resistência a estímulos prejudiciais e aumentando o reparo epitelial;
- 5) ativando e liberando moléculas efetoras imunes (VAN VLIET *et al.*, 2010).

Várias estratégias, incluindo analgesia parentérica, tratamento com antibióticos e nutrição parenteral total, são usadas para neutralizar os efeitos mais adversos da mucosite em pacientes (DUNCAN; GRANT, 2003). No entanto, a modulação do tratamento (uso de doses mais baixas ou intervalos de recuperação longos entre doses) continua a ser o meio mais eficaz para limitar a incidência real e gravidade. Isto, naturalmente, reduz a eficácia da terapia, uma vez que algumas células neoplásicas também sobrevivem ou se recuperam (DUNCAN; GRANT, 2003; FILICKO; LAZARUS; FLOMENBERG, 2003).

Além disso, imunonutrientes têm sido testados no tratamento da mucosite. Dentre estes, destacam-se a capsaicina (LOPES *et al.* 2014), arginina (LEOCÁDIO *et al.*, 2015), ácidos graxos ômega-3 (GENEROSO *et al.*, 2015) e ácido linoleico conjugado sintético (BARROS *et al.*, 2016). Esses agentes mostraram efeitos positivos na regulação dos processos imunológicos e inflamatórios da doença.

Com relação ao emprego do FOS na mucosite intestinal, existe apenas um estudo publicado investigando sua ação em modelo de mucosite induzida por 5-FU. Este estudo demonstrou que o FOS foi capaz de reduzir a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), no intestino delgado proximal de ratos tratados com quimioterapia (SMITH *et al.*, 2008), porém não se observou outros efeitos benéficos. Diante disso, verifica-se que a realização de novos estudos é necessária, a fim de elucidar quais os reais efeitos e os mecanismos associados a ação do FOS na mucosite intestinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, em camundongos, os efeitos do pré-tratamento e do tratamento com FOS na mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU e investigar possíveis mecanismos envolvidos na ação deste prebiótico.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a severidade da mucosite em animais suplementados ou não com FOS por meio do consumo alimentar e evolução ponderal;
- Investigar alguns parâmetros relacionados com a integridade da mucosa intestinal, considerando a permeabilidade intestinal e aspectos histológicos e morfométricos;
- Avaliar alguns fatores envolvidos na resposta inflamatória como infiltrado inflamatório e estresse oxidativo;
- Avaliar a produção de ácidos graxos de cadeia curta induzida pela administração do FOS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Balb/c, com 6 semanas de idade, adquiridos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CeBio) da UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG, submetidos a ciclo diurno/noturno de 12 horas e com livre acesso a ração e água filtrada. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA), sob o protocolo nº. 366 / 2012 (ANEXO A).

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em 5 grupos:

Controle (CTL): Gavagem com 0, 0,2 mL de solução salina entre os dias 1 e 6 do experimento e sem indução de mucosite.

FOS (FOS): Gavagem com 0,2 mL de solução contendo 240 mg de FOS entre os dias 1 e 10 do experimento e sem indução de mucosite.

Mucosite (MUC): Gavagem com 0,2 mL de solução salina entre os dias 1 e 6 do experimento e indução de mucosite com 5-FU.

Pré-tratado (PT): Gavagem com 0,2 mL de solução contendo 240 mg de FOS entre os dias 1 e 6 do experimento e indução de mucosite com 5-FU.

Tratado (T): Gavagem com 0,2 mL de solução contendo 240 mg de FOS entre os dias 7 e 10 do experimento e indução de mucosite com 5-FU.

Os grupos suplementados com FOS foram divididos em: pré-tratado (PT) (antes da indução da mucosite) e tratado (T) (durante a mucosite), com a finalidade de avaliar a ação deste prebiótico na proteção/prevenção ou atenuação da mucosite induzida por 5-FU e determinar alguns possíveis mecanismos envolvidos na sua ação. Já o grupo FOS foi incluído no trabalho para avaliar o efeito desta suplementação na ausência da mucosite.

Previamente à escolha do desenho experimental, realizou-se um estudo piloto em que foram testadas duas doses de FOS, 3% e 6% (percentual referente ao consumo diário de ração). O suplemento, inicialmente, foi adicionado à ração dos animais. Contudo, não se observou nenhuma diferença nos testes entre os grupos

tratados e doentes. Verificou-se neste experimento piloto que os animais com mucosite intestinal se alimentavam menos que os animais do grupo controle. Diante desses resultados, decidiu-se administrar o FOS na dose de 6%, por gavagem, eliminando assim as variações de consumo do suplemento entre os animais.

4.3 Modelo experimental de mucosite intestinal

Existem diversos modelos de mucosite intestinal induzida por 5-FU descritos na literatura com a utilização de diferentes dosagens e períodos de administração do fármaco (LOGAN *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2008; VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2003).

Em nosso laboratório utiliza-se o modelo adotado por Maioli e colaboradores (2014). O modelo contempla dose única de 300mg/kg de peso administrado, por via intraperitoneal, em camundongos *Balb/c* com eutanásia 72 horas após a indução da doença.

No 7º dia de tratamento, os animais dos grupos MUC, PT e T receberam a injeção intraperitoneal (IP) contendo 300 mg/kg de 5-Fluorouracil (5-FU) (Eurofarma®), enquanto que os animais dos grupos CTL e FOS receberam injeção de salina IP com mesmo volume. O quimioterápico foi utilizado em dose única.

Após a indução da mucosite, os animais do grupo FOS e T receberam a as respectivas gavagens. No 10º dia os animais foram sacrificados para realização das análises. A Figura 5 representa o esquema do delineamento experimental.

Delineamento experimental:

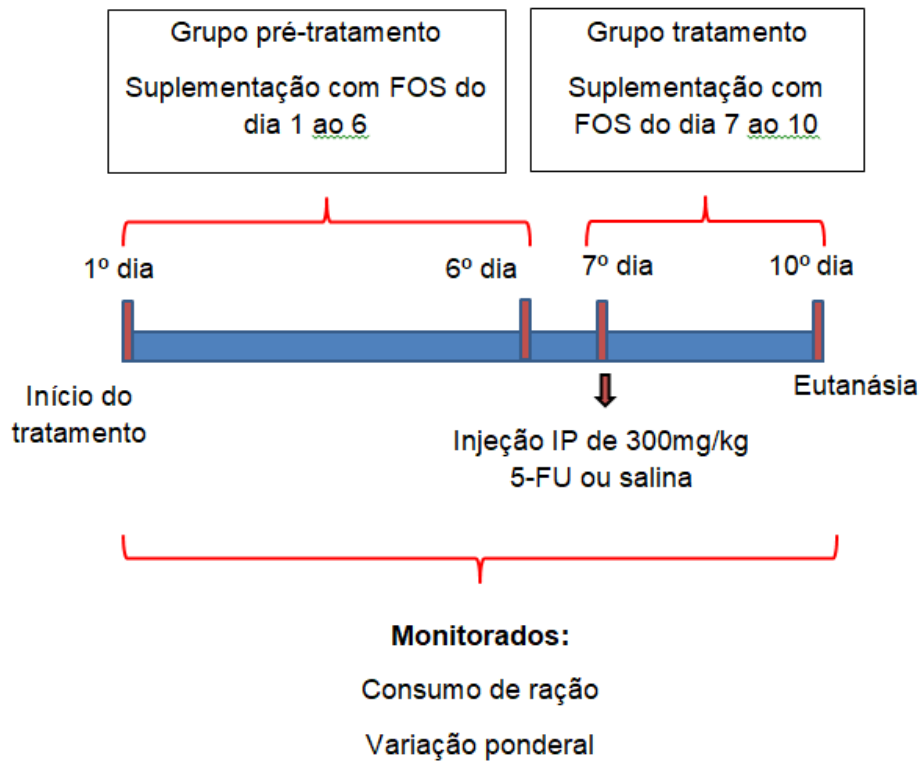


Figura 5: Delineamento experimental

4.4 Dieta e suplementação

Todos animais receberam a ração comercial Presence- Linha laboratório para ratos e camundongos durante todo o experimento.

Foi utilizado o suplemento prebiótico Nutraflora® P-95 da GTC Nutrition, trata-se de uma fibra natural produzida a partir da cana de açúcar. É composto por fruto-oligossacarídeos de cadeia curta, que consiste em 1, 2 ou 3 moléculas de frutose ligadas a 1 molécula de sacarose (GF2 = 30 a 42%, GF3 = 45 a 57% e GF4 = 5 a 15%).

A quantidade de FOS utilizada foi correspondente a 6% da dieta. Foi verificado anteriormente que a média de consumo de ração diária de cada animal era de 4 g/dia, com isso o quantitativo de suplementação de FOS diário foi de 240 mg/dia por animal (6%). O suplemento foi administrado aos animais dos grupos FOS, PT e T via gavagem. Os demais grupos (CTL e MUC) receberam salina, por gavagem, para sofrerem o mesmo estresse dos animais dos demais grupos.

A dose de 6% foi escolhida baseada em estudos experimentais que utilizaram FOS no tratamento de doenças intestinas como mucosite e colite, esse quantitativo corresponde a níveis de FOS que foram relatados como sendo de proteção sem induzir efeitos adversos (CHERBUT; MICHEL, 2003; GOTO *et al.*, 2010; LINDSAY; , K WHELAN, A J STAGG, P GOBIN, H O AL-HASSI, N RAYMENT, M A KAMM, S C KNIGHT, 2006; SMITH *et al.*, 2008).

4.5 Análises

A literatura relata que os danos causados pela mucosite intestinal acometem principalmente a porção do íleo (BARROS, 2016; NOBRE, 2017). Por esse motivo, as análises de tecido do intestino delgado foram padronizadas nesta região.

4.5.1 Consumo alimentar

Para a avaliação do consumo alimentar, a ração foi pesada em balança semi-analítica no 1º dia de experimento, no 6º e 7º dias e no 10º dia e o valor obtido foi dividido pelo número de dias. Os resultados foram apresentados em dois períodos: antes da indução da doença e após a indução da doença, com a finalidade de verificar se a mucosite intestinal interfere no consumo alimentar.

4.5.2 Variação ponderal

Os animais foram pesados em balança semi-analítica nos seguintes momentos experimentais:

- No início do experimento – 1º dia experimental;
- 3 dias após o início do experimento - 4º dia experimental
- Antes da administração do quimioterápico – 7º dia experimental;
- Após administração do quimioterápico – 8, 9 e 10º dia experimental.

Foi avaliada a variação de peso, em gramas (ganho ou perda de peso antes e após a indução da mucosite).

4.5.3 Estudo da permeabilidade intestinal

O teste da PI foi realizado 72 horas após a administração de 5-FU (dia 10). Em nosso laboratório para realização desta análise utiliza-se um método baseado no emprego do ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) marcado com o radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc -DTPA). O ^{99m}Tc -DTPA é um radiofármaco comumente utilizado em exames de medicina nuclear para fins de estudos dinâmicos dos rins. Trata-se de um complexo (^{99m}Tc -DTPA) inerte e hidrossolúvel com peso molecular aproximadamente de 500 daltons apresentando características ideais para avaliação da PI. O Tecnécio-99m (^{99m}Tc) é um radionuclídeo artificial originado da desintegração radioativa do Molibdênio-99, isótopo proveniente da fissão nuclear do urânio (ARAUJO *et al.*, 2002; DINIZ *et al.*, 2005). É muito utilizado em procedimentos clínicos de medicina nuclear e em pesquisas básicas, devido ao seu baixo custo, alta disponibilidade, tempo de meia-vida curta (6 horas), emissão de radiação gama (140 keV) e energia de radiação (ARAUJO, 2015).

Inicialmente, realizou-se a marcação do DTPA com ^{99m}Tc . Para tanto, utilizou-se reagente liofilizado contendo 10mg de DTPA e 0,5mg do agente redutor cloreto estano (SnCl₂ · 2H₂O). O reagente foi reconstituído com 1mL de solução de pertecnetato de sódio (Na $^{99m}\text{TcO}_4$), obtidos de um gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m (IPEN/CNEN, São Paulo). Esta preparação foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos (COSTA *et al.*, 2013). Após esse tempo, os animais receberam por gavagem 0,1mL de solução de ^{99m}Tc -DTPA contendo 18,5MBq de atividade.

Para realizar a correção de decaimento radioativo do ^{99m}Tc , alíquotas de igual volume de ^{99m}Tc -DTPA, denominadas de padrão, foram colocadas em tubos e tiveram a radioatividade determinada no mesmo tempo (ANDRADE *et al.*, 2015b)

Após 4 horas da gavagem os animais foram anestesiados com solução de xilazina (15 mg/kg de peso vivo) e cloridrato de cetamina (80mg/kg de peso vivo), o sangue foi coletado da veia cava inferior para contagem da radioatividade em contador de radiação gama (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3) e determinação da PI. Os resultados obtidos foram comparados com o padrão da dose e calculados em percentual da dose por g de sangue com a seguinte fórmula (ANDRADE *et al.*, 2015b):

% dose de ^{99m}Tc -DTPA no sangue = [(cpm do sangue X 100) / cpm da dose (Padrão) administrada]

Onde: cpm= contagem por minuto

4.5.4 Análise histológica

Os intestinos foram cortados longitudinalmente, estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda anti-mesentérica, removendo todo o seu conteúdo sem danos à mucosa, de acordo com o método descrito por Arantes e colaboradores (2004). A porção do íleo foi seccionada do restante do intestino e tecido foi transferido para um recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 30 minutos para pré-fixação. Em seguida, os órgãos pré-fixados foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocambolos) da porção distal em direção à proximal. Os rolos foram fixados por imersão em solução de formol a 4% por 24 horas. O material foi processado para inclusão em parafina e secções de 4 μm de cada amostra foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas microscópicas foram examinadas por patologista e lesões da mucosa e muscular foram avaliadas usando um sistema de classificação histopatológica descrito por Soares *et al.* (2008) (tabela 3).

Tabela 3: Escore histológico

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

Fonte: Soares *et al.*, 2008, p.92

As imagens fotográficas foram obtidas através do microscópio Olympus BX51 acoplado à câmera digital através do software Image-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, EUA). As lâminas foram analisadas pela Prof^a. Dr^a. Camila Megale

de Almeida Leite (Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG).

4.5.5 Análise do infiltrado inflamatório por meio da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO), peroxidase de eosinófilos (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG)

O íleo dos animais foram removidos para a determinação indireta do infiltrado de neutrófilos (MPO), eosinófilos (EPO) e macrófagos (NAG) (WERNER; SZELENYI, 1992), sendo em seguida armazenados em freezer -80 °C até o momento da análise. Para realização das análises, as amostras foram limpas com PBS 1x, pesadas em balança analítica e separadas em duas partes (LEONEL, 2012; LEONEL *et al.*, 2013).

Aproximadamente 40 mg de tecido foram utilizados para dosagem de MPO e NAG. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato e centrifugadas por 10 minutos a 4 °C. Nessa etapa, separou-se uma alíquota para dosagem de proteínas. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi ressuspensionado em solução salina 0,2% e solução salina 1,6% com 5% de glicose. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado ressuspensionado em HETAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio - Sigma) 0,5% diluído em tampão fosfato. As amostras foram então divididas em duas alíquotas, uma para dosagem de MPO e outra para NAG (LEONEL, 2012; LEONEL *et al.*, 2013). A partir desse momento, as amostras receberam tratamentos distintos.

Para quantificação da MPO, as amostras foram congeladas por 3 vezes, em nitrogênio líquido. As suspensões foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. Posteriormente, adicionaram-se 25 µL das amostras (duplicata) em uma placa de 96 poços, juntamente com 25 µL de substrato para a MPO, TMB (3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina – Sigma) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma). A placa foi incubada a 37 °C por 5 minutos. Após este tempo, adicionaram-se 100 µL de peróxido de hidrogênio a 0,002% e novamente incubou-se a 37 °C por 5 minutos. Para interromper a reação, acrescentou-se ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M (LEONEL, 2012; LEONEL *et al.*, 2013). A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450

nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Após a normalização pela concentração de proteína (LOWRY *et al.*, 1951), o resultado foi expresso em concentração de MPO por mg de proteína.

Para quantificar a enzima NAG, adicionou-se Triton X-100 (0,1%; Sigma) e centrifugou-se por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, 100 µL de sobrenadante (duplicata) foram adicionados em uma placa de 96 poços, juntamente com 100 µL de substrato para NAG (*p*-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina - Sigma) em tampão citrato / fosfato. Após a incubação a 37 °C por 5 minutos, 100 µL de tampão de glicina a 0,2 M foram usados para interromper a reação (LEONEL, 2012; LEONEL *et al.*, 2013). A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 400 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Após a normalização pela concentração de proteína (LOWRY *et al.*, 1951), o resultado foi expresso em concentração de NAG por mg de proteína.

Aproximadamente 20 mg foram utilizadas para dosagem de EPO. As amostras foram homogeneizadas em PBS 1x e centrifugadas por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, acrescentou-se salina 0,2% e salina 1,6% acrescida de 5% de glicose e centrifugou-se novamente por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em HETAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio - Sigma) 0,5% diluído em tampão fosfato. As suspensões foram congeladas por 3 vezes, em nitrogênio líquido e centrifugadas por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante (75 µL) foi adicionado a uma placa de 96 poços juntamente com 75µL do substrato OPD (1,2 diaminobenzeno, 1,2 fenilenodiamina – Sigma) diluído em tampão Tris-HCl a 0,0075 mM acrescido de peróxido de hidrogênio a 6,6 mM. Após a incubação a temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1M (LEONEL, 2012; LEONEL *et al.*, 2013). A absorbância foi medida por espectrofotometria em comprimento de onda de 492 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) Após a normalização pela concentração de proteína (LOWRY *et al.*, 1951), o resultado foi expresso em concentração de EPO por mg de proteína.

4.5.6 Análise do estresse oxidativo no íleo

O íleo dos animais também foi utilizado para avaliação do estresse oxidativo. Após o descongelamento, as amostras foram pesadas em balança analítica, 50mg de tecido foram então homogeneizadas com 0,5 mL de PBS 1x gelado e centrifugadas a 9000xg por 10 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi separado para as análises descritas abaixo (LEOCÁDIO *et al.*, 2015; LEONEL, 2012).

4.5.6.1 Avaliação da peroxidação lipídica por TBARS

A peroxidação lipídica foi avaliada por medida indireta: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), onde o principal produto é o malonaldeído (MDA). Com a formação do MDA, pela quebra de ácidos graxos poli-insaturados, é possível determinar o grau de peroxidação lipídica, uma vez que o TBARS reage com o MDA, formando uma molécula capaz de ser detectada espectrofotometricamente (LEONEL, 2012).

Para essa análise foram adicionados 250 µL do sobrenadante do íleo a uma solução contendo 500 µL de ácido tricloroacético (15%), ácido tiobarbitúrico (0,0375%) e ácido clorídrico (HCL 0,25 N). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e, então, colocadas sob água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750 µL de álcool butílico em cada amostra, e os tubos foram vigorosamente agitados. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, e 200 µL do sobrenadante foram plaqueados, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (LEOCÁDIO *et al.*, 2015; LEONEL, 2012). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no íleo (LOWRY *et al.*, 1951), como descrito no item 4.5.6.5.

4.5.6.2 Dosagem da concentração de hidroperóxidos

O ensaio da oxidação ferrosa do xilenol laranja consiste basicamente na oxidação de íons ferrosos (Fe^{2+}) a férricos (Fe^{3+}) sob condições ácidas pelos

hidroperóxidos (NOUROOZ-ZADEH; TAJADDINI-SARMADI; WOLFF, 1994). Utiliza-se o indicador xilenol laranja, uma vez que este se liga ao íon férrico produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, detectado espectrofotometricamente (LEOCÁDIO *et al.*, 2015; LEONEL, 2012).

Uma parte da solução FOX (dissolução do xilenol laranja e do sulfato ferroso amoniacal em 250 mM de H₂SO₄ para uma concentração final de 1 e 2,5 mM, respectivamente) foi diluída em nove partes da solução de metanol contendo 4,4 mM de hidroxitolueno butilado (BHT), obtendo-se, assim, o reagente FOX-2. Posteriormente, adicionaram-se 180 µL do reagente FOX-2 a 20 µL de sobrenadante do óleo, diretamente na microplaca, em triplicata. Em seguida, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos, e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (LEOCÁDIO *et al.*, 2015; LEONEL, 2012).

Realizou-se, também, a redução dos hidroperóxidos com trifenilfostina (TPP). A TPP é utilizada como eficiente ferramenta para distinção entre peróxido de hidrogênio e outros peróxidos (não-H₂O₂), já que a presença de TPP indica o teor de peróxido de hidrogênio na amostra (NOUROOZ-ZADEH; TAJADDINI-SARMADI; WOLFF, 1994). Ao sobrenadante do óleo (15 µL) adicionaram-se 5 µL da solução de TPP em metanol (TPP a 10mM), diretamente na microplaca, em triplicata. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, 180 µL do reagente FOX-2 foram acrescentados e as amostras foram mantidas novamente a temperatura ambiente por mais 30 minutos. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (LEOCÁDIO *et al.*, 2015; LEONEL, 2012).

A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos ($4,3 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$), e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azul-arroxeadado ($1,5 \times 10^{-4} \text{M}^{-1}$). A quantificação dos hidroperóxidos da amostra foi alcançada pela subtração das dosagens com TPP daquelas sem TPP (sem TPP - com TPP = quantidade de hidroperóxidos da amostra), e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína no óleo (LOWRY *et al.*, 1951), como descrito no item 4.5.6.5.

4.5.6.3 Dosagem da atividade da enzima superóxido dismutase

Para esta dosagem, adicionaram-se em duplicata, diretamente na microplaca, 30 μL do sobrenadante de íleo, 99 μL do BS 1x, 6 μL do brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium e 15 μL do pirogalol. No branco, o pirogalol foi substituído por PBS 1x, e no padrão a amostra foi substituída por PBS 1x. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 37 °C e para interromper a reação adicionaram-se 150 μL de DMSO. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 570 nm (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) (LEONEL, 2012). Para o cálculo da atividade, considerou-se que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a auto-oxidação de 50% de pirogalol do padrão. O resultado foi normalizado pela concentração de proteína no íleo (LOWRY *et al.*, 1951) como descrito no item 4.5.6.5. Após a normalização, o resultado foi expresso em unidades de SOD por g de proteína.

4.5.6.4 Dosagem da atividade enzima da catalase

Para esta dosagem, 25 μL do sobrenadante do tecido já diluído (1:10) em PBS 1x foram acrescentados a 1 mL de PBS 1x em cubeta de quartzo. Acrescentaram-se 25 μL de solução de H_2O_2 0,3 M e a absorbância foi medida espectrofotometricamente, em comprimento de onda de 240 nm por um minuto. Os cálculos foram determinados pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado foi normalizado pela concentração de proteína no íleo (LOWRY *et al.*, 1951), como descrito no item 4.5.6.5. Após a normalização pela concentração de proteína no íleo, o resultado foi expresso em delta E por minuto por g de proteína (LEONEL, 2012).

4.5.6.5 Dosagem de proteína

A dosagem da concentração de proteína nos fragmentos do íleo foi realizada de acordo com Lowry (1951). Para isso, em 250 μL de amostra diluída (1:50) foram adicionados 250 μL da solução A (uma parte de sulfato de cobre, uma parte de tartarato de sódio e 100 partes de carbonato de sódio) e 25 μL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:2). Em seguida, as amostras foram agitadas em vórtex e

incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras (200 µL) foram então adicionadas à placa de 96 poços e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 660 nm. Os resultados foram expressos em mg/mL depois de obtida a fórmula pela curva padrão, feita com albumina.

4.5.7 Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes

As fezes dos animais foram coletadas no dia 10 do experimento para dosagem de AGCC e em seguida armazenadas em freezer -80°C até o momento da análise. As análises foram realizadas em duplicata, segundo proposto por Smiricky-Tjardes *et al.* (2003). Para a extração, foi adicionado às amostras ácido m-fosfórico 25%, agitado e mantido em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13500 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 13200 rpm por 20 minutos e congelado a -20 °C. Para a dosagem, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm e aplicadas no Cromatógrafo a Gás (SMIRICKY-TJARDES *et al.* 2003)

As análises dos AGCC acetato, propionato e butirato foram realizadas em cromatógrafo a gás modelo CGMS – QP 5000 marca SHIMADZU acoplado a um microcomputador equipado com detector para o registro da análise dos cromatogramas utilizando-se o programa *GC Solution*. Os respectivos ácidos foram separados e identificados em coluna capilar NUKOL (30 m x 0,25 mm x 0,01 mm); Para a separação cromatográfica, 1 mL de amostra foi injetada com auxílio de seringa de 10mL (Hamilton®) em sistema *Splitless* no modo SIM (Sistema de Monitoramento de Íons). O gás hélio foi utilizado como carreador com velocidade linear programada para 38,5 cm/s. As temperaturas do injetor e do detector foram respectivamente de 200 °C e 220 °C. A programação da coluna com temperatura inicial a 80 °C (mantida por 5 minutos), aumentando em 12 °C por minuto até atingir 180 °C e finalizando a 2 5°C por minuto até atingir 220 °C (mantida por 20 minutos) totalizando 34,13 minutos de análise. A massa foi scaneada de 40 a 400 m/z. O fluxo da fase móvel na coluna foi de 1,1 mL/minuto. As amostras foram analisadas

pela Profa. Dra. Maria do Carmo Gouveia Peluzio do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.5.8 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.01. Os resultados foram avaliados pelo teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov. Os resultados foram analisados por teste *one-way* ANOVA e teste de *post hoc* de *Newman-Keuls*, para o escore histológico foi utilizado o teste Kruskal-Wallis ANOVA e Dunn's Tests. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados como diferença estatística significativa.

5 RESULTADOS

5.1 Consumo alimentar e variação ponderal

Os dados relativos ao consumo alimentar e variação ponderal durante o período experimental de 6 dias (anterior à indução da mucosite) mostraram consumo alimentar similar em todos os grupos ($p>0,05$), assim como ganho de peso ($p>0,05$), conforme mostra a figura 6.

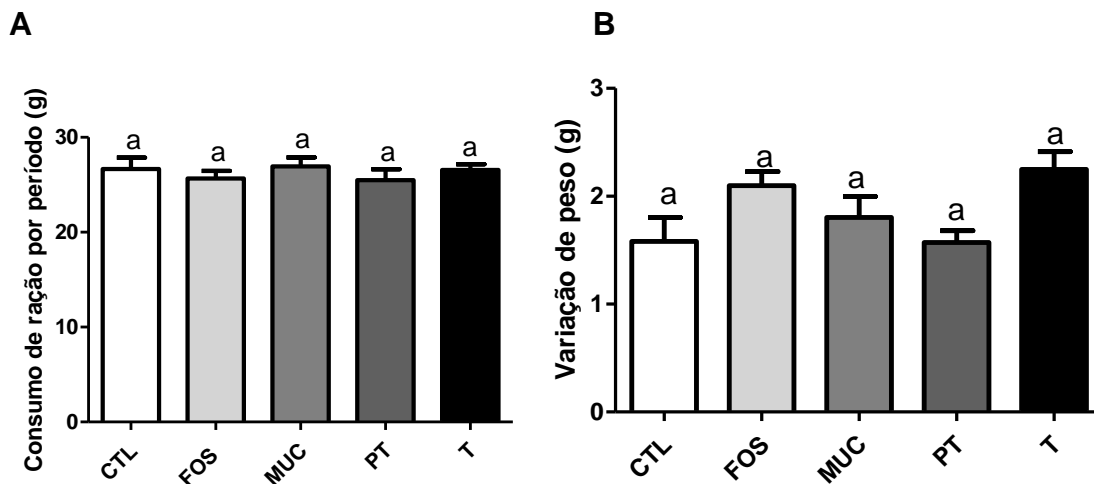


Figura 6 – Variação do consumo alimentar (A) e variação do peso (B) antes da indução da mucosite (1º ao 6º dia).

Dados são expressos como média \pm SEM ($n=10$). Letras iguais indicam que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

Entretanto, após a indução da mucosite (Figura 7), o consumo alimentar foi menor nos animais dos grupos MUC, PT e T quando comparado com os demais grupos ($p<0,05$). Os animais dos grupos MUC, PT e T apresentaram perda de peso quando comparados aos animais dos grupos CTL e FOS ($p<0,05$) (figura 7).

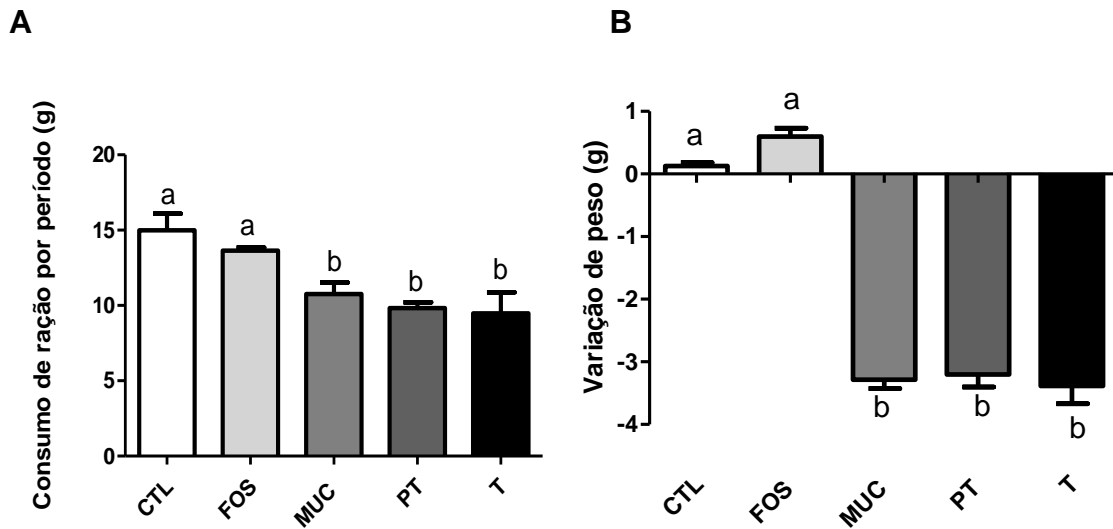


Figura 7 – Variação do consumo alimentar (A) e variação do peso (B) após a indução da mucosite (7^o ao 10^o dia) .

Dados são expressos como média \pm SEM (n=10). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

Avaliando apenas o período da mucosite, foi observado que o FOS foi não capaz de minimizar o consumo de ração e a perda de peso dos animais que receberam o quimioterápico.

5.2 Permeabilidade intestinal

O estudo da PI foi realizado após 72 horas da administração de 5-FU (dia 10). Verificou-se maior permeabilidade intestinal nos animais do grupo mucosite (MUC) em relação a todos os grupos ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística entre eles ($p > 0,05$) (Figura 8), demonstrando que a utilização do FOS promove alterações benéficas, reduzindo a PI a níveis fisiológicos em animais doentes pré-tratados ou tratados com o mesmo.

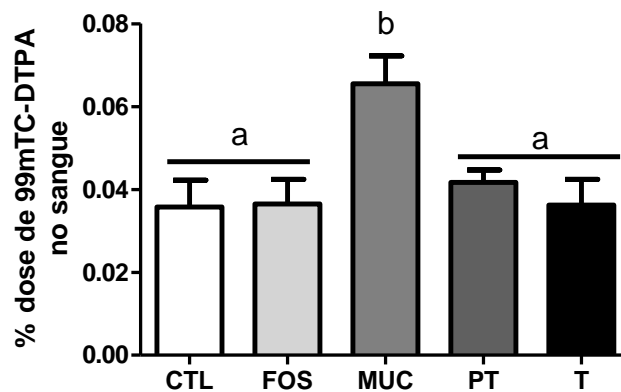


Figura 8 – Permeabilidade intestinal 72 horas após a indução da mucosite

Dados são expressos como média \pm SEM (n=9). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

5.3 Análises histológicas

Foram observados aspectos histológicos normais na mucosa dos camundongos do grupo CTL, assim como daqueles tratados por FOS (Figura 9 A e B). Vilosidades encurtadas, intensa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e camada muscular, necrose de cripta e perda da arquitetura tecidual foram observadas no grupo mucosite (Figura 9 C). Os camundongos com mucosite pré-tratados e tratados por FOS (Figura 9 D e E, respectivamente) demonstraram preservação parcial das vilosidades e criptas, com infiltração de células inflamatórias.

No sistema de escore, observou-se escore 0 no grupo CTL e FOS indicando ausência de inflamação, escore 3 no grupo MUC, o que corresponde à inflamação elevada com aumento da densidade vascular e espessamento de parede, necrose das criptas e intenso infiltrado inflamatório. Os grupos suplementados com FOS (PT e T) apresentaram redução significativa no escore (escore entre 2 e 3) quando comparado ao grupo MUC ($p < 0,05$) (Figura 10).

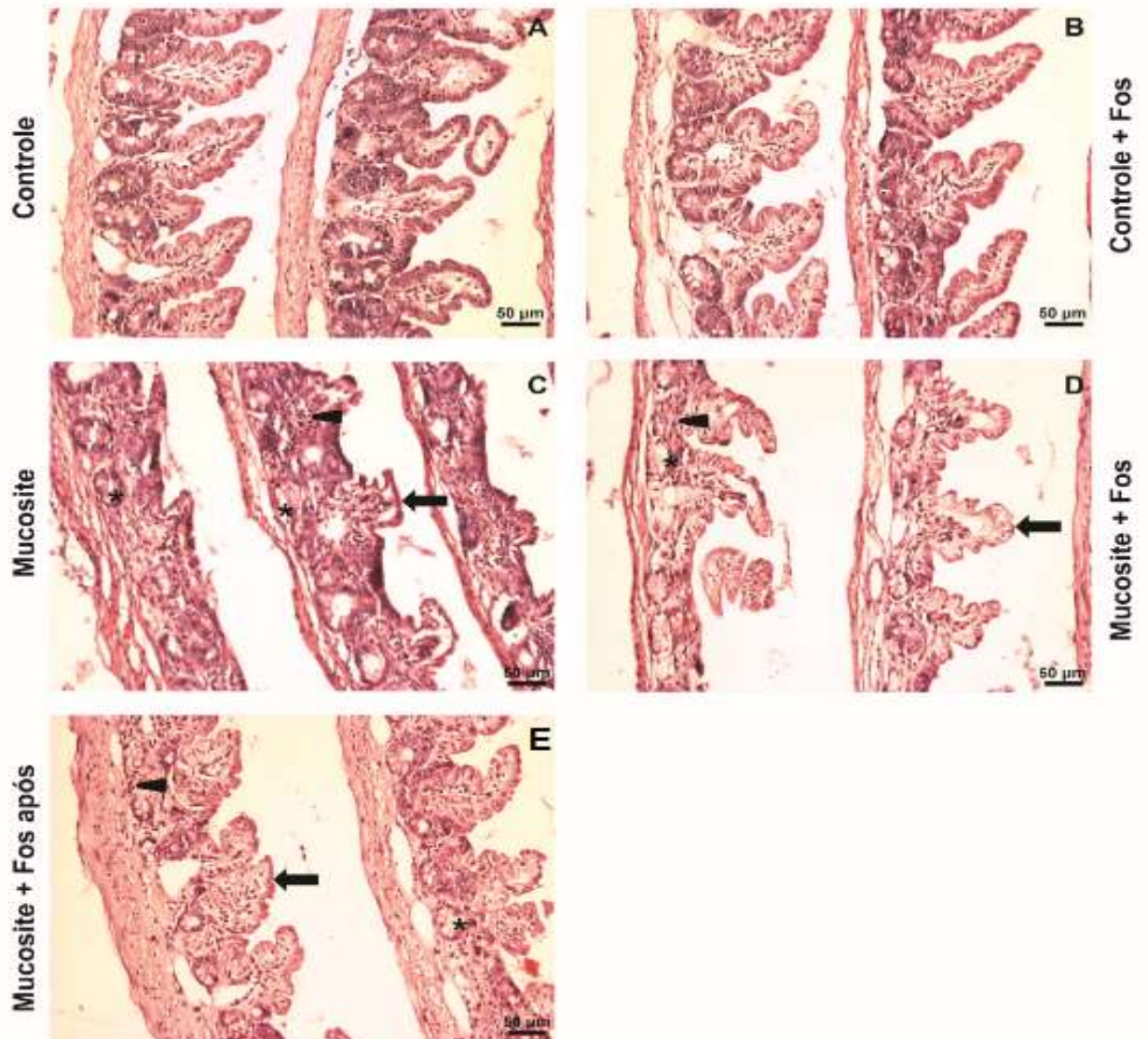


Figura 9: Análise histológica do íleo

Aspectos normais para os grupos CTL (A) e grupo FOS (B). Vilosidades encurtadas (setas), intensa infiltração de células inflamatórias (cabeça de seta) e necrose de cripta (asteriscos) estão presentes no grupos mucosite (C). Preservação parcial das vilosidades (setas) e criptas (asteriscos) e presença de células inflamatórias (pontas de setas) são observadas nos grupos PT ou T (D e E, respectivamente). Barra = 50 uM, coloração HE. CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

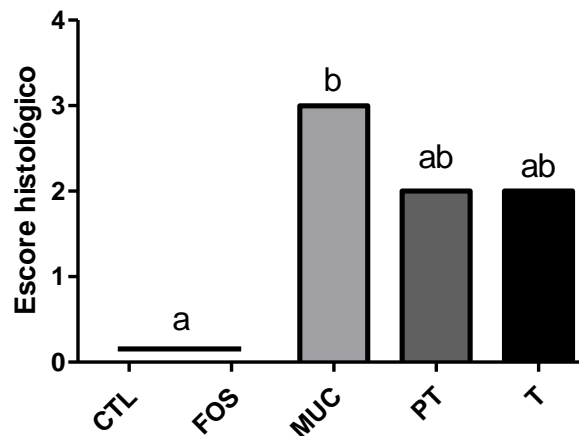


Figura 10 – Escore histológico

Dados são expressos como mediana \pm SEM (n=5). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; Kruskal-Wallis ANOVA e Dunn's Tests). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

5.4 Avaliação do infiltrado inflamatório

A medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) é utilizada como medida indireta da infiltração de neutrófilos no tecido. A atividade de MPO apresentou alterações, com aumento da atividade da enzima no grupo MUC ($p < 0,05$). Os grupos CTL, FOS, PT e T não apresentaram diferença estatística entre eles ($p > 0,05$) (Figura 11A). Os resultados observados sugerem um possível efeito do FOS na redução da infiltração de neutrófilos.

A infiltração de macrófagos pode ser medida indiretamente pela atividade de enzima n-acetilglicosaminidase (NAG). A atividade de NAG não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 11B).

A atividade da enzima peroxidase de eosinófilos (EPO) é utilizada como medida indireta da infiltração de eosinófilos no tecido. A atividade de EPO apresentou alterações, com aumento da atividade da enzima no grupo MUC ($p < 0,05$). Os grupos CTL, FOS, PT e T não apresentaram diferenças estatística entre eles ($p > 0,05$) (Figura 11C). Os resultados observados sugerem um possível efeito do FOS na redução da infiltração de eosinófilos.

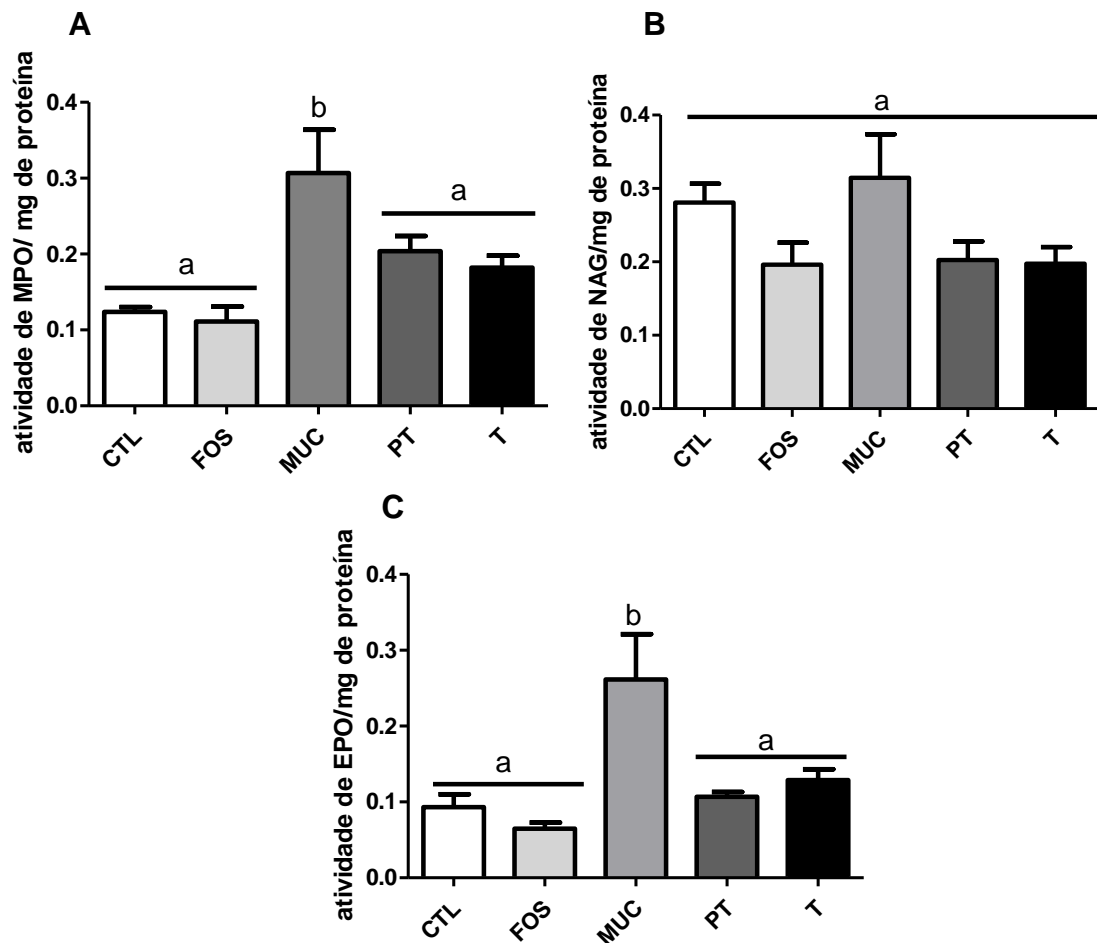


Figura 11 – Infiltrado Inflamatório no íleo.

(A) Infiltrado de neutrófilos (MPO), (B) Infiltrado de macrófagos (NAG), (C) Infiltrado de eosinófilos (EPO). Dados são expressos como média \pm SEM de atividade das enzimas por mg de proteína (n=6). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

5.5 Avaliação do estresse oxidativo

A peroxidação lipídica pode ser medida pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é mensurada pela concentração de um dos seus principais produtos, o malondialdeído (MDA). Na avaliação desse parâmetro, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados ($p > 0,05$) (Figura 12A). Com relação à dosagem de hidroperóxidos (Figura 12B), também não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que participa da eliminação de radicais superóxido (O_2^-) (DIETERICH *et al.*, 2000). A atividade da enzima foi menor nos grupos MUC, PT e T ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CTL (Figura 12C).

A enzima catalase também é antioxidante, sua atividade baseia-se no declínio da absorvância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LEONEL, 2012; NELSON; KIESOW, 1972). A atividade da enzima catalase foi menor no grupo MUC ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 12D).

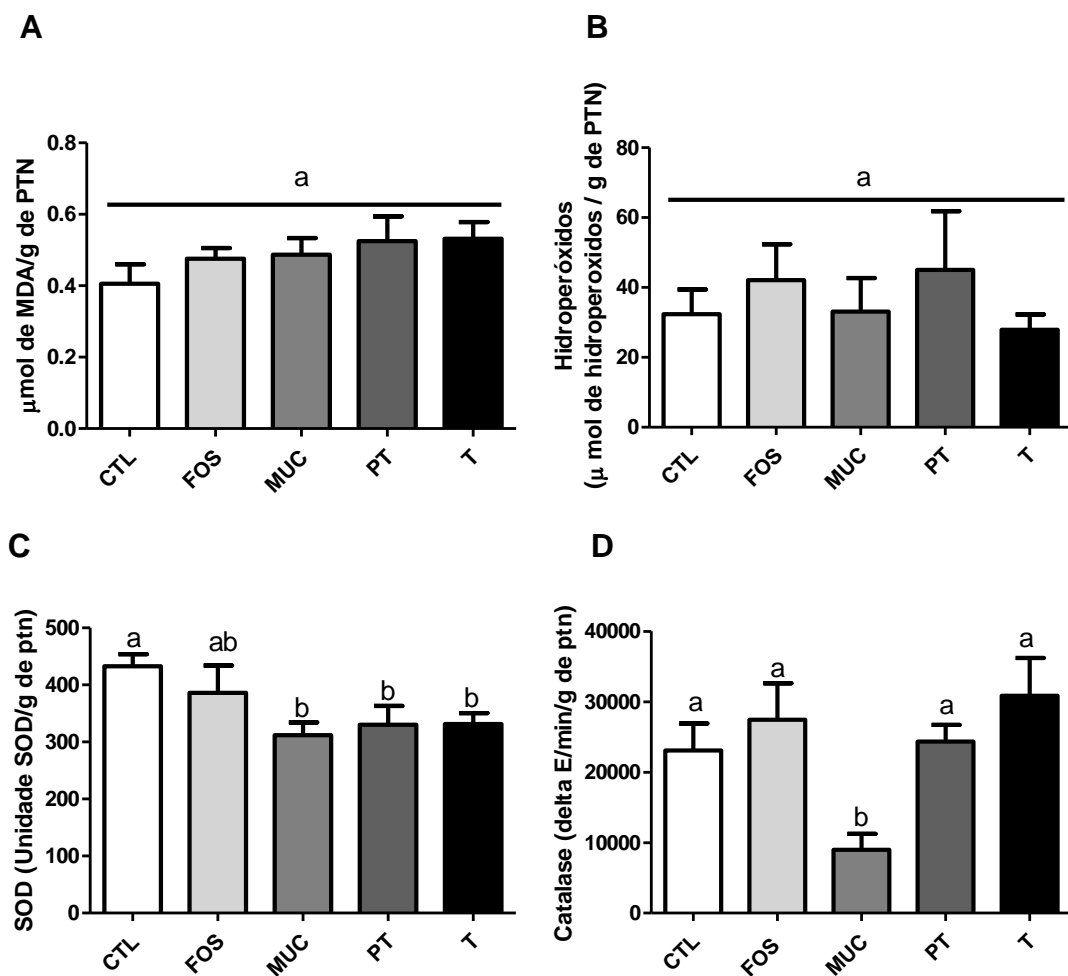


Figura 12 – Avaliação do estresse oxidativo no íleo.

(A) Concentração de TBARS (B) Concentração de hidroperóxidos (C) Concentração SOD (D) Concentração de Catalase. Dados são expressos como média ± SEM (n=6). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

5.6 Dosagem de AGCC nas fezes

A concentração de acetato e butirato foi maior no grupo PT quando comparado ao grupo MUC, demonstrando que o pré-tratamento com FOS foi capaz de aumentar a produção desses AGCC ($p < 0,05$). Já o grupo T não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo MUC ($p > 0,05$).

A concentração de propionato nas amostras foi muito pequena e, portanto não foi possível quantificar.

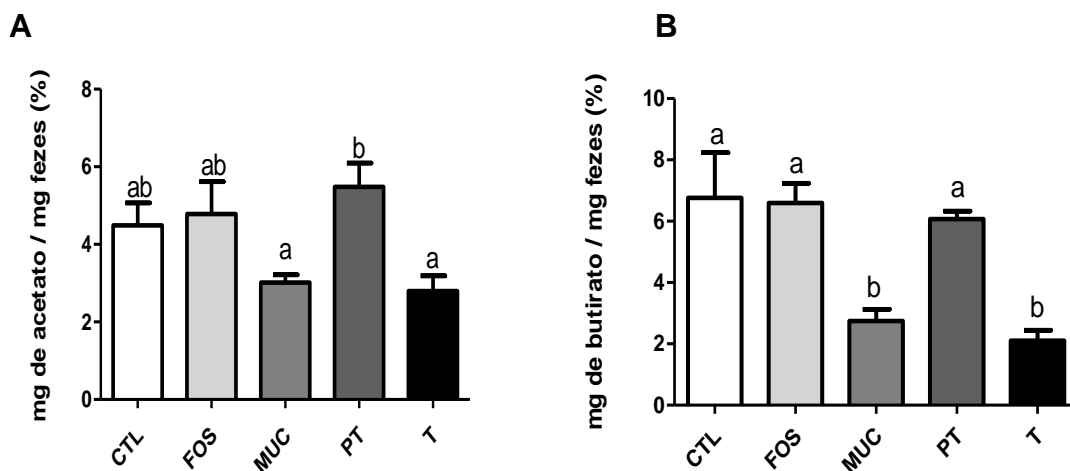


Figura 13 – Dosagem de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes

(A) Concentração de acetato nas fezes, (B) Concentração de butirato nas fezes. Dados são expressos como média \pm SEM ($n=8$). Letras diferentes indicam que há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$; one-way ANOVA e Newman-Keuls Multiple Comparison Test). CTL= controle, FOS = controle FOS, MUC = mucosite, PT= pré-tratado, T= tratado.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos os prebióticos tem recebido atenção por estimularem o sistema imune, o que contribui para reduzir a inflamação no epitélio intestinal e, conseqüentemente, propicia indiretamente a redução da translocação bacteriana do lúmen intestinal para órgãos estéreis. Além disso, os prebióticos destacam-se também como potentes moduladores da microbiota intestinal beneficiando a saúde do hospedeiro. Atuam alimentando e estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos reduzem o pH e algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal (AZIMIRAD *et al.*, 2016; GIBSON *et al.*, 2010; PANDEY; NAIK; VAKIL, 2015; VANDEPUTTE *et al.*, 2017; WILSON; WHELAN, 2017).

O presente estudo teve como objetivo investigar o impacto da suplementação com FOS em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU, em duas modalidades o pré-tratamento e tratamento, antes e após a indução da doença, respectivamente.

A mucosite induzida por quimioterápicos é fator limitante na terapia contra o câncer. A doença inflamatória atinge as células de toda a mucosa do trato gastrointestinal, causando ulcerações e sintomas debilitantes (SOARES *et al.*, 2008; SONIS, 2004). Trabalhos do nosso grupo de pesquisa mostraram que a toxicidade proveniente da administração de 5-FU (300 mg/kg), por via intraperitoneal, foi observada em camundongos (BARROS *et al.*, 2016; GENEROSO *et al.*, 2015).

No presente estudo, observou-se que os camundongos dos grupos que receberam a injeção intraperitoneal de 5-FU (MUC, PT e T) apresentaram diminuição da ingestão alimentar e do peso corporal durante o período da doença (Figura 6). Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos por Leocádio *et al.* (2015), Generoso *et al.* (2015), Barros *et al.* (2016) que já haviam mostrado redução no consumo alimentar e perda significativa de peso nos animais que receberam este quimioterápico. Observou-se ainda que o pré-tratamento e o tratamento com FOS não contribuíram para reduzir os efeitos adversos do 5-FU no que diz respeito à ingestão de ração e perda de peso. As lesões intestinais provocadas pela administração de 5-FU podem prejudicar o processo de absorção de nutrientes, contribuindo para maior perda de peso (BARROS *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2012).

A mucosite pode causar alteração da integridade da mucosa intestinal e disfunção da barreira, o que resulta em maior permeabilidade intestinal (PI) aos alérgenos, toxinas e patógenos, levando ao estresse imunológico e à inflamação (RAO; SAMAK, 2013). O ^{99m}Tc -DTPA é uma macromolécula que raramente atravessa a barreira intestinal em condições fisiológicas, entretanto, quando a PI está aumentada devido à lesão da mucosa, a presença de DTPA na corrente sanguínea pode ser detectada em maior quantidade. Uma das vantagens da utilização de traçadores radioativos é sua fácil detecção quando comparado com os métodos convencionais de avaliação de permeabilidade intestinal (JORGENSEN *et al.*, 2006; VIANA, 2010). A investigação da PI neste trabalho foi determinada pelo percentual de ^{99m}Tc -DTPA presente no sangue dos animais. O grupo MUC apresentou aumento do percentual de dose (%) de ^{99m}Tc -DTPA no sangue quando comprado aos animais dos demais grupos (Figura 8). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram aumento na PI 72 horas após a administração de 5-FU (ANTUNES *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2016; GENEROSO *et al.*, 2015), corroborando com os nossos achados. Esse aumento correlaciona-se com o comprometimento da arquitetura intestinal, necrose de criptas, presença intenso de infiltrado inflamatório e edema observados na imagem histológica do grupo MUC e na avaliação da enzimas MPO e EPO (Figuras 9 e 11). Sabe-se que o infiltrado inflamatório, caracterizado pela presença de neutrófilos e eosinófilos, pode promover alterações nas proteínas das junções firmes e aderentes, aumentando a PI (MAEDA *et al.*, 2010; RAO *et al.*, 2002; SHETH *et al.*, 2010).

Os resultados dos grupos CTL e FOS, mostraram níveis fisiológicos de ^{99m}Tc -DTPA no sangue (Figura 8). Esses dados também estão em concordância com os resultados das análises histológicas do íleo, pois não foram identificadas alterações aparentes nas camadas celulares e tampouco evidências de inflamação (Figura 9). Já os grupos PT e T mostraram também níveis fisiológicos de PI (Figura 8), apesar de os estudos histológicos terem mostrado preservação parcial das vilosidades e criptas da mucosa intestinal, entretanto, com arquitetura mais preservada quando comparada com os animais do grupo MUC (Figura 9). É provável que a diminuição da intensidade e extensão da inflamação associada a arquitetura mais preservada da mucosa contribuíram para redução da PI nos grupos suplementados com FOS.

Desta forma, é razoável pensar que o FOS apresenta ação trófica sobre a mucosa intestinal, contribuindo para a manutenção de níveis fisiológicos da permeabilidade intestinal. Esse achado abre a perspectiva de investigar, em trabalhos futuros, a ação do FOS sobre as proteínas de junções firmes ocludina e zonulina que sabidamente exercem um papel importante sobre a integridade dos espaços intercelulares responsáveis pela permeabilidade intestinal paracelular, conforme descrito na literatura (ANDRADE et al., 2015c; PUROHIT et al., 2008; RAO; SAMAK, 2013).

Ao quantificar as alterações pelo escore e imagens histológicas, observou-se que os animais dos grupos CTL e FOS apresentaram resultados dentro da normalidade (escore 0). Nos animais do grupo MUC, o 5-FU induziu o encurtamento das vilosidades de maneira significativa, aumentou a profundidade das criptas e apresentou intensa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (escore 3) (Figura 10), corroborando com os achados de Soares *et al.* (2008), Hamouda *et al.* (2017) em modelo de mucosite em ratos e camundongos induzida por 5-FU (150 mg/kg em dose única e 50 mg/kg por 6 dias). Os animais do grupo PT e T mostraram preservação parcial das vilosidades e criptas, com menor infiltração de células inflamatórias quando comparadas ao grupo MUC (Figura 10).

O infiltrado inflamatório tecidual participa do processo de fagocitose, produção de EROs e liberação de mediadores inflamatório (CRUVINEL *et al.*, 2010). A presença de infiltrado inflamatório na mucosa intestinal, como neutrófilos, macrófagos e monócitos é uma característica da mucosite, resultado do aumento das moléculas de adesão que resultam da ativação NF- κ B (SONIS, 2004; YE *et al.*, 1993). O aumento de infiltrado celular tem sido relatado em diversos trabalhos que avaliaram a mucosite induzida por 5-FU, como os de Azevedo *et al.* (2012), Ferreira *et al.* (2012), Soares *et al.* (2008), Barros *et al.* (2016) e Lindsay *et al.* (2010).

No presente trabalho observou-se maior infiltrado de neutrófilos no íleo dos animais do grupo MUC, enquanto que nos grupos CTL, FOS, PT e T os resultados obtidos não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre eles (Figura 11). A infiltração de neutrófilos foi avaliada, indiretamente, pela medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) por ser encontrada especialmente neste tipo de células. Os neutrófilos são as primeiras células ativadas na defesa do organismo, migrando até o local da infecção/inflamação para destruir antígenos instalando-se preferencialmente na lâmina própria e nas criptas intestinais (AL-ASMARI et al.,

2016; WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013). Estas células possuem importante ação efetora através da liberação de radicais livres e componentes tóxicos, como a enzima MPO, causando a morte de diversos patógenos (NAITO; TAKAGI; YOSHIKAWA, 2007; VINOLO *et al.*, 2011). Nos estudos de Azevedo *et al.* (2012), Hamouda *et al.* (2017) e Quaresma *et al.* (2016), os camundongos com mucosite induzida por 5-FU apresentaram aumento dos níveis intestinais da enzima MPO. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho estão em conformidade com os dados descritos pelos autores citados acima.

O infiltrado de macrófagos (atividade de NAG) no íleo não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os diversos grupos investigados (Figura 11). Os macrófagos são tipo celular importante que age como primeira linha de defesa contra as bactérias patogênicas, além de serem células apresentadoras de antígenos (MACHADO *et al.*, 2004). Resultados similares foram encontrados nos trabalhos de Santos (2011), Ferreira *et al.* (2012) e Leocádio *et al.* (2015). Esperava-se maior atividade de NAG no grupo MUC devido as características da mucosite intestinal, contudo GAZINNELLI *et al.* (2010) relatam que os macrófagos podem ser residentes na mucosa e que provavelmente a menor atividade de NAG observada nos grupos que receberam o 5-FU reflita apenas a redução do número de células residentes na mucosa lesada. Assim, a atividade de NAG reflete mais a integridade da mucosa do que o processo inflamatório propriamente dito. Esse fator pode significar que a NAG talvez não seja um bom parâmetro para avaliar a migração de macrófagos em tecidos com alterações tróficas.

O infiltrado de eosinófilos apresentou resultados similares àqueles observados para os neutrófilos, com aumento apenas no grupo MUC (Figura 11). A peroxidase de eosinófilos (EPO) é bastante empregada para estudo indireto da atividade de eosinófilos em tecidos e seu aumento foi relatado em modelo de mucosite intestinal após administração de 5-FU por Lopes (2014), Leocádio *et al.* (2015) e Barros *et al.* (2016). Os eosinófilos são leucócitos formados e maturados na medula óssea e liberados na circulação, são também considerados como sentinelas imunológicas efectoras por apresentarem ação rápida em processos inflamatórios, atuando como células apresentadoras de antígenos (BARTHEL *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2004). A presença de eosinófilos na mucosa intestinal em doenças inflamatórias intestinais está associada às condições clínicas desfavoráveis, como má-absorção, perda de peso e alterações na arquitetura da mucosa, com

diminuição das criptas no cólon e achatamento das vilosidades (ROTHENBERG, 2004).

A suplementação com FOS (grupos PT e T) foi capaz de controlar o infiltrado inflamatório, diminuindo a atividade das enzimas MPO e EPO (Figura 11). Considerando a participação dessas células no aumento da inflamação e do estresse oxidativo, é provável que o FOS tenha contribuído para a menor infiltração de neutrófilos e eosinófilos no intestino delgado, mostrando seu papel como anti-inflamatório, podendo auxiliar na redução do dano causado na mucosa intestinal. Neste contexto, a redução do infiltrado inflamatório repercutiu diretamente sobre os níveis de permeabilidade intestinal (PI) observado nesse trabalho para aqueles animais que receberam a suplementação com o FOS, indicando correlação direta entre inflamação e PI.

Além do infiltrado inflamatório, o estresse oxidativo também foi avaliado, devido à sua importância na iniciação da mucosite (MAEDA *et al.*, 2010; SONIS, 2004). O aumento do estresse oxidativo é um dos efeitos da quimioterapia com 5-FU, participando tanto no início da mucosite quanto na fase de amplificação dos sinais pró-inflamatórios, culminando na ulceração do tecido (LONGLY; G., 2003; SONIS, 2004). Foram quantificadas as concentrações de malondialdeído (MDA), uma das principais substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), as concentrações de hidroperóxidos, importante produto da peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase.

O estresse oxidativo causa danos às macromoléculas celulares como os ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios estruturais. Dentre estes alvos, a peroxidação de lipídios é particularmente prejudicial porque seus produtos levam a uma fácil propagação de reações de radicais livres (ECHTAY, 2007; PEREIRA, 2010). Danos aos lipídeos possuem grande significância particularmente pelo fato de que podem causar lesões nas membranas celulares e culminar na morte celular (GOETZ; LUCH, 2008; POWERS; JACKSON, 2008).

A peroxidação lipídica foi medida por dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), mensurada pela concentração de malondialdeído (MDA), o principal aldeído reativo formado na peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas biológicas (LOPES, 2014) e também pela formação de hidroperóxidos, sendo este um resultado específico de peroxidação lipídica causada por ação de radicais livres (HERMES-LIMA; WILLMORE; STOREY, 1995;

PEREIRA, 2010).

Neste estudo, não foram observadas diferenças entre os grupos investigados em relação à peroxidação lipídica por TBARS e concentração de hidroperóxidos (Figura 12). Resultados similares foram descritos por Leocádio *et al.* (2015), Lopes (2014) e Antunes *et al.* (2016) na análise do íleo dos animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU. MAEDA *et al.* (2010) relataram que o aumento da peroxidação lipídica ocorre no período entre 24 horas e 48 horas após a indução da mucosite em animais tratados com metotrexato, ressaltando que, decorridas 72 horas após a indução, observaram retorno aos níveis normais de produção. TAKUMA *et al.* (2008) também observaram, em mucosite oral por 5-FU, um aumento da peroxidação lipídica no primeiro dia após a indução, já no 5º dia os níveis voltaram ao normal. Esses achados contribuem para justificar a razão pela qual não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados. Cumpre ressaltar que, no presente trabalho as análises de MDA e hidroperóxidos foram avaliadas 72 h após a indução da mucosite pelo 5-FU. Em um próximo estudo seria interessante avaliar a peroxidação lipídica em diferentes períodos, visando observar se o 5-FU e o FOS exercem algum efeito sobre esses parâmetros relativos à peroxidação lipídica.

A enzima superóxido dismutase (SOD) participa do sistema antioxidante e constitui a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido (O_2^-), catalisando a dismutação dos radicais O_2^- a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma forma menos nociva e que pode ser degradada por catalase e glutathione peroxidase, outras enzimas antioxidantes (DIETERICH *et al.*, 2000; GOETZ; LUCH, 2008; POWERS; JACKSON, 2008). A catalase atua em várias funções bioquímicas, mas seu principal objetivo é catalisar a reação de transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Estas enzimas compõem parte do sistema antioxidante do organismo atuando como importantes reguladores das espécies reativas de oxigênio (AFONSO *et al.*, 2007; POWERS; JACKSON, 2008).

A dosagem da atividade dessas enzimas no íleo dos animais apresentou diferença entre os grupos. Na análise da enzima SOD, os grupos MUC, PT e T apresentaram diminuição da atividade quando comparado ao grupo CTL, já o grupo FOS apresentou níveis intermediários (Figura 12). Na análise da catalase, apenas o grupo MUC apresentou redução da atividade da enzima (Figura 12). Esses resultados estão em concordância com os achados de Soares (2009), Justino (2015)

e Quaresma (2016), onde demonstraram que o 5-FU pode reduzir a atividade de enzimas antioxidantes. Estudos clínicos tem evidenciado que pacientes sob tratamento com quimioterápicos apresentam uma redução da capacidade antioxidante após o tratamento quimioterápico. As enzimas antioxidantes protegem as células por meio da conjugação e conseqüentemente remoção de metabólitos reativos produzidos durante a peroxidação lipídica. Dessa forma a redução dos níveis basais das mesmas indica a presença de intenso estresse oxidativo (AHMED; SELIM; EL-SAYED, 2017; QUARESMA, 2016), portanto a redução da SOD e catalase nos grupos MUC sugere a existência do estresse oxidativo na mucosite.

A suplementação com FOS aumentou a atividade da enzima catalase (Figura 12), e esses maiores níveis nos grupos PT e T corroboram com as análises histológicas dos animais, pois eles apresentaram criptas intestinais mais preservadas e menor presença de células inflamatórias quando comparadas ao grupo MUC (Figura 9). Os resultados encontrados sugerem que a suplementação com FOS pode auxiliar no metabolismo celular, reduzindo a produção de EROs e melhorando o processo inflamatório. Em concordância com os resultados obtidos neste trabalho, Yen *et al.* (2011) demonstraram que a suplementação de FOS apresentou ação antioxidante em idosos constipados, associando este efeito à sua ação bifidogênica. Os autores concluíram que as bifidobactérias colônicas são provavelmente um componente vital envolvido nos efeitos antioxidantes do FOS em seres humanos. Li *et al.* (2007) mostraram em ratos que o FOS sintético aumentou a atividade de enzimas antioxidantes. Estudos *in vitro* demonstraram que a redução do estresse oxidativo está relacionada com ativação de sistemas de reparo de DNA e de enzimas antioxidantes (HAMER *et al.*, 2008). Franco-Robles e Lopez (2015) relatam que os frutanos tem a capacidade de eliminação de EROs, sendo que os efeitos dos AGCC produzidos pela fermentação induzem a expressão de enzimas antioxidantes cruciais.

Em relação à produção de AGCC, foi observado aumento produção dos AGCC acetato e butirato no grupo PT quando comparado ao grupo MUC (Figura 13). A produção de AGCC é uma via indireta dos efeitos do FOS que tem demonstrado importante papel na barreira intestinal. O aumento de AGCC favorece a produção de mucina no cólon (COMALADA *et al.*, 2006; FRANCO-ROBLES; LÓPEZ, 2015) e exerce efeitos tróficos sobre o intestino grosso, através do contato direto dos ácidos com a mucosa colônica. Esse trofismo ocorre de maneira

transmural, devendo-se não somente ao aumento da área de superfície e da proliferação celular da mucosa, mas também, ao estímulo na síntese de DNA, RNA e proteínas. Os mecanismos de trofismo colônico ocorrem por aumento na oxigenação energética, estímulo do fluxo na microcirculação sanguínea por dilatação das artérias de resistência, produção de hormônios enterotróficos e estímulo do sistema nervoso entérico. O aumento do fluxo sanguíneo na parede do cólon atrófico facilita e promove o crescimento em todas as camadas da parede intestinal (OLIVEIRA, 2011).

O butirato, um dos ácidos graxos mais estudados e importantes, afeta componentes da barreira de defesa colônica, garantindo proteção contra antígenos do lúmen pela regulação da expressão de genes e enzimas e induz diminuição na permeabilidade intestinal (relacionada com a expressão de proteínas responsáveis pela junção celular) (FERREIRA *et al.*, 2012; MENZEL *et al.*, 2004; PENG *et al.*, 2007). Este ácido graxo também evita translocação bacteriana (FERREIRA *et al.*, 2012).

Diferentemente do grupo PT, o grupo T não apresentou aumento na produção desses AGCC quando comparado ao grupo MUC (Figura 13). A produção de AGCC é determinada por uma série de fatores, incluindo o número e composição da microbiota presente no cólon, tipo de substrato e tempo de trânsito intestinal (WONG; JENKINS, 2007) e essa diferença entre os grupos quanto à produção de AGCC pode estar relacionada a esses fatores.

Em relação à microbiota intestinal, sabe-se que FOS tem potenciais benefícios na prevenção e tratamento de doenças intestinais e pode atuar modulando a microbiota intestinal, estimulando bifidobactérias comensais (BALI *et al.*, 2015; CAETANO *et al.*, 2016; KOLEVA *et al.*, 2012; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008). Em diversos estudos realizados em humanos e animais, a suplementação de FOS aumentou a ocorrência de bactérias benéficas, tais como lactobacilos e bifidobactérias, enquanto diminuiu a contagem de potenciais agentes patogênicos, tais como *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli* (BORNET *et al.*, 2002; KOLEVA *et al.*, 2012; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008; SABATER-MOLINA *et al.*, 2009). O aumento na produção de AGCC do grupo PT pode estar relacionado à modulação da microbiota com a utilização do FOS nos 6 primeiros dias de experimento. Essa modulação possivelmente foi capaz de proporcionar maior produção de AGCC.

A hipótese é que, no grupo T, o tempo de utilização do FOS (4 dias) não foi suficiente para aumentar a produção de AGCC quando comparado ao grupo MUC. Segundo os estudos de Blay *et al* (1999) e Koleva *et al* (2014) a produção de AGCC advindas da fermentação de FOS é dependente do tempo de utilização deste suplemento, sendo este um fator importante a ser considerado. Outro fator a ser considerado é que, quando os animais deste grupo receberam a injeção de 5-FU, sua microbiota intestinal não tinha sido modulada pelo FOS como possivelmente ocorreu no grupo PT. Além disso, o fármaco é capaz de diminuir substancialmente o número e a diversidade da microbiota (FIJLSTRA; FERDOUS; KONING, 2015), esses fatores podem então ter interferido na produção de AGCC pelo grupo T.

Com essa diferença entre os grupos PT e T na produção de AGCC, pode-se inferir que os benefícios da utilização do FOS na mucosite intestinal podem estar relacionados não apenas à produção de AGCC, mas também a outros fatores envolvidos nesse processo.

7 CONCLUSÃO

O pré-tratamento e tratamento com FOS apresentaram efeitos benéficos sobre a mucosite intestinal, reduzindo o infiltrado inflamatório, com preservação parcial da arquitetura da mucosa intestinal, aumentando os níveis da enzima antioxidante catalase com consequente redução da permeabilidade intestinal.

O pré-tratamento contribuiu para aumentar a produção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato e butirato, indicando modulação da microbiota intestinal tempo dependente.

Outros fatores além da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) estão envolvidos na ocorrência dos efeitos benéficos decorrentes da suplementação do FOS.

Portanto, os resultados obtidos sugerem que os FOS podem constituir-se em uma estratégia alternativa para a prevenção e/ou tratamento da mucosite intestinal, induzida por agentes quimioterápicos.

8 PERSPECTIVAS:

- Avaliar o efeito do FOS sobre as proteínas de junções firmes;
- Investigar o processo de translocação bacteriana empregando a ^{99m}Tc -E.coli;
- Avaliar alguns parâmetros do sistema imunológico por meio de dosagens de quimiocinas e citocinas;
- Determinar a microbiota intestinal para ambas modalidades de tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABDELOUHAB, K. et al. Mucosal intestinal alteration in experimental colitis correlates with nitric oxide production by peritoneal macrophages: Effect of probiotics and prebiotics. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 34, n. 4, p. 590–597, 2012.
- AFONSO, V. et al. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, v. 74, n. 4, p. 324–329, 2007.
- AHMED, A. A. M.; SELIM, M. A. A.; EL-SAYED, N. M. α -Lipoic acid ameliorates oral mucositis and oxidative stress induced by methotrexate in rats. Histological and immunohistochemical study. **Life Sciences**, v. 171, p. 51–59, 2017.
- AL-ASMARI, A. K. et al. Alleviation of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats by vitamin E via targeting oxidative stress and inflammatory markers. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 13, n. 4, p.1-9, 2016.
- AL-LAHHAM, S. H. et al. Biochimica et Biophysica Acta Biological effects of propionic acid in humans; metabolism , potential applications and underlying mechanisms. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 11, p. 1175–1183, 2010.
- ALA, S. et al. Efficacy of sucralfate mouth wash in prevention of 5-fluorouracil induced oral mucositis: a prospective, randomized, double-Blind, controlled trial. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 3, p. 456–463, 2016.
- ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v.34, p.1080-1087, 2015a.
- ANDRADE, M. E. R. et al. Pretreatment and Treatment With L-Arginine Attenuate Weight Loss and Bacterial Translocation in Dextran Sulfate Sodium Colitis. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 40, n. 8, p. 1131–1139, 2015b.
- ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1080–1087, 2015c.
- ANTUNES, M. M. et al. Pretreatment with l-citrulline positively affects the mucosal architecture and permeability of the small intestine in a murine mucositis model. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v.40, n.2, p.279-286, 2016.
- ANTUNIASSI, A. R. **Ocorrência e grau de severidade da mucosite bucal em relação ao fluxo salivar de pacientes sob quimioterapia**. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, 2005.
- ARAUJO, J. G. V. C. et al. Technetium-^{99m} labeling anti-amastigote polyclonal antibodies of *Leishmania amazonensis*. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 29, n. 4, p. 405–411, 2002.

ARAÚJO, R. S. **Avaliação das propriedades biológicas de sistemas nanoestruturados contendo fármacos em modelo animal experimental: lipossomas contendo cisplatina e nanocápsulas radiomarcadas com ^{99m}Tc - MIBI** 2015. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

AZEVEDO, O. G. R. et al. Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **BMC Gastroenterology**, v. 12, p. 35, 2012.

AZIMIRAD, M. et al. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 54, p. 516–522, 2016.

BARCELO, A et al. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. **Gut**, v. 46, n. 2, p. 218–224, 2000.

BARROS, P. A. V. DE. **Efeitos do ácido linoleico conjugado (CLA) proveniente de fonte natural e sintético sobre a mucosite intestinal induzida por 5-FU**. 2016. 167 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

BARROS, P. A. V. DE et al. Effect of conjugated linoleic acid-enriched butter after 24 hours of intestinal mucositis induction. **Nutrition and Cancer**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2016.

BARTHEL, S. R. et al. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. **Journal of leukocyte biology**, v. 83, n. 1, p. 1–12, 2008.

BELORKAR, S. A.; GUPTA, A. K. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 82, 2016.

BHOMIG, G. A. et al. Stable prodrugs of n-butyric acid: suppression of T cell alloresponses *in vitro* and prolongation of heart allograft survival in a fully allogeneic rat strain combination. **Transplant Immunology**, v. 3274, n. 99, p. 221–227, 1999.

BINDELS, L. B. et al. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303–310, 2015.

BINDER, H. J.; MEHTA, P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption *in vitro* in the rat distal colon. **Gastroenterology**, v. 96, n. 4, p. 989–996, 1989.

BLAIR, S. A. et al. Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 2, p. 191–201, 2006.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 41 Suppl 1, p. 11–16, 2002.

BORNET, F. R. J. et al. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. **Digest Liver MS**, v. 34, n. 2002, p.111-120, 2002.

BOUHNIK, Y. et al. Effects of fructo-oligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. **Lawrence Erlbaum Associates**, v.26,n.1 p. 37–41, 1996.

BOUHNIK, Y. et al. Human nutrition and metabolism increases fecal Bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1, p. 113–117, 1999.

BOUHNIK, Y. et al. Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. **Nutrition Journal**, v. 6, n. 1, p. 42, 2007.

BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Animal Models of Mucositis: Implications for Therapy. **Journal of Supportive Oncology**, v. 9, n. 5, p. 161–168, 2011.

BUDDINGTON, K. K.; DONAHOO, J. B.; BUDDINGTON, R. K. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 3, p. 472–477, 2002.

CAETANO, B. F. R. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. **Nutrients**, v. 8, n. 7, 2016.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 30, p. 268–282, 1999.

CHANG, P. V et al. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **PNAS Early Edition**, v.7, n.3, p. 1–6, 2013.

CHEN, H.L. et al. Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men. **Nutrition Research**, v. 20, n. 12, p. 1725–1733, 2000.

CHERBUT, C.; MICHEL, C. Biochemical and molecular actions of nutrients the prebiotic characteristics of fructooligosaccharides are necessary for reduction of tnbs-induced colitis in rats. **Biochemical and Molecular Actions of Nutrients**, v.133, p. 21–27, 2003.

CHOQUE DELGADO, G. T. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. **Nutrition Research**, v. 32, n. 11, p. 884–892, 2012.

COLLINS, S.; REID, G. Distant site effects of ingested prebiotics. **Nutrients**, v.8, n.523, p. 1–20, 2016.

COMALADA, M. et al. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. **Journal of Cancer**

Research and Clinical Oncology, v. 132, n. 8, p. 487–497, 2006.

COOK, S. I.; SELLIN, J. H. Review article: short chain fatty acids in health and disease. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 12, p. 499–507, 1998.

COSTA, KATIA A. et al. L-Arginine supplementation prevents increases in intestinal permeability and bacterial translocation in male swiss mice subjected to physical exercise under environmental heat stress. **The Journal of Nutrition - Nutrition Immunology**, v. 20, p. 218–223, 2013.

COVINGTON, D. K. et al. The G-protein-coupled receptor 40 family (GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. 5, p. 770–773, 2006.

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

CRUVINEL, W. D. M. et al. Fundamentals of innate immunity with. **Brazilian Journal Rheumatology**, v. 55, n. 11, 2010.

CUMMINGS, J. H.; CHRISTIE, S.; COLE, T. J. A study of fructo oligosaccharides in the prevention of travellers' diarrhoea. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, n. 8, p. 1139–1145, 2001.

DELZENNE, N. M. Oligosaccharides: state of the art. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, n. 1, p. 177–182, 2003.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. D. M.; BURINI, R. C. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, n. 1, p. 93–98, 2010.

DI BARTOLOMEO, F.; VAN DEN ENDE, W. Fructose and fructans: opposite effects on health? **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 227–237, 2015.

DIETERICH, S. et al. Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. **Circulation**, v. 101, n. 1, p. 33–39, 2000.

DINIZ, S. O. F. et al. Assessment of bacterial translocation in obstructive jaundice using Tc-99m Escherichia coli. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 45–49, 2005.

DOUILLARD, J. et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **The Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1041–1047, 2000.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: Oral and intestinal mucositis - Causes and possible treatments. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 853–874, 2003.

ECHTAY, K. S. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 10, p. 1351–1371, 2007.

ELTING, L. S. et al. The burdens of cancer therapy: Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, v. 98, n. 7, p. 1531–1539, 2003.

FERREIRA, T. M. et al. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids**, v. 47, n. 7, p. 669–678, 2012.

FIJLSTRA, M.; FERDOUS, M.; KONING, A. M. Substantial decreases in the number and diversity of microbiota during chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. **Support Care Cancer**, v. 23, p. 1513–1522, 2015.

FILICKO, J.; LAZARUS, H. M.; FLOMENBERG, N. Mucosal injury in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: new approaches to prophylaxis and treatment. **Bone marrow transplantation**, v. 31, n. 1, p. 1–10, 2003.

FLINT, H. J.; DUNCAN, S. H.; SCOTT, K. P. Minireview Interactions and competition within the microbial community of the human colon : links between diet and health. **Environmental Microbiology**, v. 9, p. 1101–1111, 2007.

FLORES-MALTOS, D. A. et al. Biotechnological production and application of fructooligosaccharides. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 259–267, 2016.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, n. 2002, p. 287–291, 2002.

FRANCO-ROBLES, E.; LÓPEZ, M. G. Implication of fructans in health: Immunomodulatory and antioxidant mechanisms. **Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

GE, H. et al. Activation of G Protein-Coupled Receptor 43 in Adipocytes Leads to Inhibition of Lipolysis and Suppression of Plasma Free Fatty Acids. **Endocrinology**, v. 149, n. May, p. 4519–4526, 2008.

GENEROSO, S. D. V. et al. Dietary supplementation with omega-3 fatty acid attenuates 5-fluorouracil induced mucositis in mice. **Lipids in Health and Disease**, p. 1–10, 2015.

GIBSON, G. R. et al. Oligofructose and Inulin. **Gastroenterology**, v. 108, p. 975–982, 1995.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 259, 2004.

GIBSON, G. R. et al. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2010.

GOETZ, M. E.; LUCH, A. Reactive species: A cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, v. 266, n. 1, p. 73–83, 2008.

GOTO, H. et al. Effects of fructo-oligosaccharide on dss-induced colitis differ in mice fed nonpurified and purified diets. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 15, p. 2121–2127, 2010.

GOTO, K. et al. Isolation and Structural Analysis of Oligosaccharides from Yacon (Polymnia sonchifolia). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 12, p. 2346–2347, 2014.

HAMAKER, B. R.; TUNCIL, Y. E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 23, p. 3838–3850, 2014.

HAMER, H. M. et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, V.27, P- 104-119, 2008.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271–280, 1995.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, O. et al. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of Lactobacillus. **Food Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 355–361, 2012.

HONEYCUTT, T. C. B. et al. Probiotic administration and the incidence of nosocomial infection in pediatric intensive care: A randomized placebo-controlled trial. **Pediatric Critical Care Medicine**, v. 8, n. 5, p. 452–458, 2007.

IVANOV, I. I.; HONDA, K. Intestinal commensal microbes as immune modulators. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 496–508, 2012.

JOHANSSON, M. E. V et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Gut Microbes**, v. 1, n. 1, p. 51–54, 2010.

JOHNSON, I. T. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1171–1178, 2002.

JONES, J. A. et al. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. **Supportive Care in Cancer**, v. 14, n. 6, p. 505–515, 2006.

JORGENSEN, V. L. et al. Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 11, p. 1790–1796, 2006.

KEEFE, D. M. K.; GIBSON, R. J.; HAUER-JENSEN, M. Gastrointestinal mucositis. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 20, n. 1, p. 38–47, 2004.

KELLY, G. Inulin-type prebiotics--a review: part 1. **Alternative medicine Review**, v. 13, n. 4, p. 315–329, 2008.

KELLY, G. Inulin-type prebiotics: A review (Part 2). **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 1, p.36-55, 2009.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010.

KOLEVA, P. T. et al. Inulin and fructo-oligosaccharides have divergent effects on colitis and commensal microbiota in HLA-B27 transgenic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 9, p. 1633–1643, 2012.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Synbiotics in health and disease. **Annual Review of Food Science Technology**, v. 2, p. 373–93, 2011.

KYAZZE, G. et al. Direct fermentation of fodder maize, chicory fructans and perennial ryegrass to hydrogen using mixed microflora. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8833–8839, 2008.

WANG, L.; et al. Effects of different oligosaccharides at various dosages on the composition of gut microbiota and short-chain fatty acids in mice with constipation. **Food & Function**, p. 1–46, 2017.

LALLA, R. V.; SONIS, S. T.; PETERSON, D. E. Management of Oral Mucositis in Patients Who Have Cancer. **Dental Clinics of North America**, v. 52, n. 1, p. 61–77, 2008.

LEOCÁDIO, P. C. L. **Efeito do pré-tratamento com L-arginina na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

LEOCÁDIO, P. C. L. et al. L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. **Nutrition and Cancer**, v. 67, n. 3, p. 486–493, 2015.

LEONEL, A. J. **Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano Efeitos e Mecanismos de Ação da Tributirina na Proteção da Colite Ulcerativa Induzida por Sulfato de Sódio Dextrano**. 2012. 132 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

LEONEL, A. J. et al. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin supplementation on experimental colitis *British Journal of Nutrition*. **British Journal of Nutrition**, n.109, p. 1396–1407, 2013.

LI, L. S. et al. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 679–692, 2009.

LIMA, G. C. **Efeito dos oligossacarídeos FOS e GOS na microbiota intestinal e pH do conteúdo cecal de ratos Wistar em desenvolvimento.** 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

LIN, X. B. et al. Irinotecan (CPT-11) chemotherapy alters intestinal microbiota in tumour bearing rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. 3–10, 2012.

LINDSAY, J.; , K WHELAN, A J STAGG, P GOBIN, H O AL-HASSI, N RAYMENT, M A KAMM, S C KNIGHT, A. F. Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 55, p. 348–355, 2006.

LIONG, M. Safety of probiotics : translocation and infection. **Nutrition Reviews**, v. 66, n. 4, p. 192–202, 2008.

LIU, L. et al. Polyamines regulate E-cadherin transcription through c-Myc modulating intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 296, n. 4, p. 801–810, 2009.

LIU, W. et al. Selenium nanoparticles as a carrier of 5-fluorouracil to achieve anticancer synergism. **ACS Nano**, v. 6, n. 8, p. 6578–6591, 2012.

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

LOGAN, R. M. et al. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 239–251, 2009.

LONGLEY, D. B.; G., D. P. H. & P. J. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature**, v. 3, p. 330–338, 2003.

LOPES, L. G. **Efeito do uso tópico de capsaicina na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos swiss.** 2014. 152 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) . Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

LOUIS, P.; HOLD, G. L.; FLINT, H. J. The gut microbiota , bacterial metabolites and colorectal cancer. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-12, 2014.

LOWRY, O. H. et al. The folin by oliver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MACFARLANE, G. T.; MACFARLANE, S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. **Journal of AOAC International**, v. 95, p. 50–60, 2012.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and

health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 305–344, 2008.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

MAEDA, T. et al. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, n. 6, p. 1117–1123, 2010.

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

MARCHIANDO, A. M. et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation *in vivo*. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 1, p. 111–126, 2010.

MASHTOUB, S. et al. Emu Oil Combined with Lyprinol™ Reduces Small Intestinal Damage in a Rat Model of Chemotherapy-Induced Mucositis. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 7, p. 1171–1180, 2016.

MASLOWSKI, K. M. et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1282–1286, 2009.

MATTHEWS, G. M.; HOWARTH, G. S.; BUTLER, R. N. Short-chain fatty acids induce apoptosis in colon cancer cells associated with changes to intracellular redox state and glucose metabolism. **Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 102–109, 2012.

MAYNARD, C. L. et al. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231–241, 2012.

MAZMANIAN, S. K. et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 107–118, 2005.

MCCARTHY, G. . et al. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. **Oral Oncology**, v. 34, n. 6, p. 484–490, 1998.

MCRORIE, J. W.; MCKEOWN, N. M. Understanding the physics of functional fibers in the gastrointestinal tract: an evidence-based approach to resolving enduring misconceptions about insoluble and soluble fiber. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 117, n. 2, p. 251–264, 2016.

MENZEL, T. et al. Butyrate inhibits leukocyte adhesion to endothelial cells via modulation of VCAM-1. **Inflammatory bowel diseases**, v. 10, n. 2, p. 122–8, 2004.

MILLARD, A. L. et al. Butyrate affects differentiation , maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 130, p. 245–255, 2002.

MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v 68, p.587-597, 2007.

NAITO, Y.; TAKAGI, T.; YOSHIKAWA, T. Serial Review Neutrophil-Dependent Oxidative Stress in Ulcerative Colitis. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 41, p. 18–26, 2007.

NELSON, S. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, p. 474–478, 1972.

NOBRE, L. M. S. **Abatacept agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical biochemistry**, v.209, p.403-409, 1994.

OGAWA, H. et al. Butyrate modulates gene and protein expression in human intestinal endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 512–519, 2003.

OLIVEIRA, A. J. F. DE. **Emprego dos ácidos graxos de cadeia curta na colite de derivação fecal : estudo em ratos wistar**. 2011.66 f.Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

OUWEHAND, A. C. et al. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 212–217, 2005.

PAINEAU, D. et al. The effects of regular consumption of short-chain fructo-oligosaccharides on digestive comfort of subjects with minor functional bowel disorders. **The British journal of nutrition**, v. 99, p. 311–318, 2008.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7577–7587, 2015.

PARK, J. et al. Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells : Involvement of NF- κ B and ERK signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 70–77, 2007.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos : implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, p. 385–390, 2003.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **Biotech**, v. 2, n. 2, p. 115–125, 2012.

PENG, L. et al. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. **Pediatric Research**, v. 61, n. 1, p. 37–41, 2007.

PEREIRA, S. S. **Associação de estresse oxidativo e obesidade induzida por dieta na secreção de adipocinas**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014.

PINEDO, H.; PETERS, G. Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 6, n. 10, p. 1653–1664, 1988.

POOL-ZOBEL, B. L.; SAUER, J. Overview of Experimental Data on Reduction of Colorectal Cancer Risk by. **The Journal of Nutrition**, p. 2580–2584, 2007.

POWERS, S.; JACKSON, M. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243–1276, 2008.

PRYDE, S. E. et al. The microbiology of butyrate formation in the human colon. **FEMS Microbiology Letter**, v. 217, p. 133–139, 2002.

PUROHIT, V. et al. Alcohol, intestinal bacterial growth, intestinal permeability to endotoxin, and medical consequences: Summary of a symposium. **Alcohol**, v. 42, n. 5, p. 349–361, 2008.

QUARESMA, M. P. **Lactobacillus spp. e Bifidobacterium sp. Atenuam a mucosite intestinal experimental induzida por 5- Fluorouracil em camundongos**. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2016.

RAJKUMAR, H. et al. Effect of probiotic *Lactobacillus salivarius* UBL S22 and prebiotic fructo-oligosaccharide on serum lipids, inflammatory markers, insulin sensitivity, and gut bacteria in healthy young volunteers. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 289–298, 2015.

RAO, R. K. et al. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. **The Biochemical journal**, v. 368, p. 471–481, 2002.

RAO, R. K.; SAMAK, G. Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. **Current nutrition and food science**, v. 9, n. 2, p. 99–107, 2013.

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

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: Application in infant food. **Early Human Development**, v. 65, p.43-52, 2001

RIVIERE, A. et al. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p. 1-21, 2016.

ROBERFROID, M. Dietary Fiber: A Review of the Evidence Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A Review of the Evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 5, p. 353–362, 1993.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited 1 , 2. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 1, p. 830S–837S, 2007.

ROBERFROID, M. B. Fructo-oligosaccharide malabsorption: benefit for gastrointestinal functions. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 16, p. 173–177, 2000.

ROBERFROID, M. B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. S13, 2005.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilic gastrointestinal disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, p.11-28, 2004.

SABATER-MOLINA M., LARQUE E., TORRELLA F., AND Z. S. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. **Journal of Physiology & Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 315–328, 2009.

SÄEMANN, M. D. et al. Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. **The FASEB Journal** , v. 14, n. 15, p. 2380–2400, 2000.

SAMUEL, B. S. et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor , Gpr41. **PNAS Early Edition**, v. 105, n. 43, p. 16767–16772, 2008.

SCHAGGER, H.; CRAMER, W. A.; VONJAGOW, G. The folin by oliver. **Analytical Biochemistry**, v. 217, n. 2, p. 220–230, 1994.

SCHARLAU, D. et al. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 39–53, 2009.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S. Oral mucositis: A challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy. Part 2: Diagnosis and management of mucositis. **Head and Neck**, v. 26, n. 1, p. 77–84, 2004.

SEGAIN, J. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappa B inhibition: implications for Crohn's disease. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 397–403, 2000.

SELLERS, R. S.; MORTON, D. The Colon. **Toxicologic Pathology**, v. 42, n. 1, p. 67–81, 2014.

SHETH, P. et al. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in oxidative stress-induced disruption of tight junctions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 49239–49245, 2010.

SIVIERI, K. et al. Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME® model). **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 8, p. 894–901, 2014.

SMIRICKY-TJARDES, M. R. et al. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 10, p. 2535–2545, 2003.

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. 757–767, 2008.

SMITH, J. G.; YOKOYAMA, W. H.; GERMAN, J. B. Critical Reviews in Food Science and Nutrition Butyric Acid from the Diet: Actions at the Level of Gene Expression Butyric Acid from the Diet: Actions at the Level of Gene Expression. **Critical Reviews in Food Science**, v. 4, p. 259–297, 1998.

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

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

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews**, v.4, p.277-284, 2004.

SONIS, S. T. et al. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury. **Supplement to Cancer Perspectives**, v. 100, n. 9, 2004.

SONIS, S. T. Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. **ASCO. American Society of Clinical Oncology**, p. 236–240, 2013.

STENMAN, L. K.; HOLMA, R.; KORPELA, R. High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 9, p. 923–929, 2012.

STRINGER, A. M. et al. Biomarkers of chemotherapy-induced diarrhoea: A clinical study of intestinal microbiome alterations, inflammation and circulating matrix metalloproteinases. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 7, p. 1843–1852, 2013.

TANG, Y. et al. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. **Nutrition**, v. 33, p. 96–104, 2017.

THORPE, D.; STRINGER, A.; BUTLER, R. Chemotherapy-induced mucositis: The role of mucin secretion and regulation, and the enteric nervous system. **NeuroToxicology**, v. 38, p. 101–105, 2013.

TOUCHEFEU, Y. et al. Systematic review: The role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - Current evidence and potential clinical applications. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.40, p.409-421, 2014.

TRALONGO, P. et al. The role of butyric acid as a protective agent against inflammatory bowel diseases. **Euromediterranean Biomedical Journal**, v. 4, n. 11, p.24-35, 2014.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799–809, 2009.

UNTERKIRCHER, M. V. et al. Segurança no uso de probióticos em pacientes imunocomprometidos. **Jornal Brasileiro de Transplantes**, v. 15, p. 1682–1690, 2012.

VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. **Annual Review of Physiology**, v. 71, n. 1, p. 241–260, 2009.

VAN 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.

VANDEPUTTE, D. et al. Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. **Gut**, v.0, p. 1-7, 2017.

VELEZ, E. et al. Study of the effect exerted by fructo-oligosaccharides from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) root flour in an intestinal infection model with *Salmonella Typhimurium*. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 11, p. 1971–1979, 2013.

VIANA, M. L. **Arginina no processo de translocação bacteriana : permeabilidade intestinal , vias de ação e resposta imunológica na obstrução intestinal induzida em camundongos.** 2010. 75 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) , Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais , Belo Horizonte, 2010.

VINOLO, M. A. R. et al. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. **Clinical Science**, v. 117, n. 9, p. 331–8, 2009.

VINOLO, M. A. R. **Efeito dos ácidos graxos de cadeia curta sobre neutrófilos.** 2010. 147 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2010.

VINOLO, M. A. R. et al. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.

22, n. 9, p. 849–855, 2011.

VOGT, L. et al. Immunological Properties Of Inulin-Type Fructans. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, n. 55, p. 414-433, 2015.

VON BÜLTZINGSLÖWEN, 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 Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 5, p. 278–284, 2003.

WEBER, T. E.; KERR, B. J. Butyrate differentially regulates cytokines and proliferation in porcine peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 139–147, 2006.

WILGUS, T. A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 379–388, 2013.

WILSON, B.; WHELAN, K. Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.32, p.64-68, 2017.

WINKLER, J.; BUTLER, R.; SYMONDS, E. Fructo-oligosaccharide reduces inflammation in a dextran sodium sulphate mouse model of colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, n. 1, p. 52–58, 2007.

WONG, J. M. et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. **J Clin Gastroenterol**, v. 40, n. 3, p. 235–243, 2006.

WONG, J. M. W.; JENKINS, D. J. A. Carbohydrate Digestibility and Metabolic Effects. **The Journal of Nutrition**, n. 4, p. 2539–2546, 2007.

WU, R. Y. et al. Protein kinase C δ signaling is required for dietary prebiotic-induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. **Scientific Reports**, v. 7, n. December 2016, p. 40820, 2017.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427–434, 2007.

YE, T. M. VAN et al. Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. **Journal of Surgical Research**, v. 55, n. 5, p. 553–558, 1993.

YEN, C. H. et al. Beneficial effects of fructo-oligosaccharides supplementation on fecal bifidobacteria and index of peroxidation status in constipated nursing-home residents-A placebo-controlled, diet-controlled trial. **Nutrition**, v. 27, n. 3, p. 323–328, 2011.

YEOH, A. S. J. et al. Nuclear factor (NFkB) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes. **International Journal of Radiation Oncology Biology**

Physics, v. 63, n. 5, p. 1295–1303, 2005.

YU, T. et al. Effects of Prebiotics and Synbiotics on Functional Constipation. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 353, n. 3, p. 282–292, 2017.

ANEXO A**Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 366 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Impacto da utilização de imunomoduladores na inflamação intestinal em modelo experimental de mucosite”, que tem como responsável Simone de Vasconcelos Generoso, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/04/2013. Este certificado espira-se em 11/04/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 366 / 2012, related to the Project entitled “Impact of the use of immunomodulators in inflammatory bowel disease in an experimental model of mucositis”, under the supervision of Simone de Vasconcelos Generoso, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/04/2013. This certificate expires in 11/04/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 11/04/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br