



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

PRISCILLA FERNANDA CAMPOS JUSTINO

***Saccharomyces boulardii* INTERFERE NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO
CELULAR NF-KB, MAPK E TLR/MYD88 ALTERADAS PELO 5-
FLUOROURACIL.**

FORTALEZA

2016

PRISCILLA FERNANDA CAMPOS JUSTINO

***Saccharomyces boulardii* INTERFERE NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO
CELULAR NF-KB, MAPK E TLR/MYD88 ALTERADAS PELO 5-
FLUOROURACIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor (a) em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

J97

Justino, Priscilla Fernanda Campos.

Saccharomyces boulardii interfere nas vias de sinalização celular NF-kB, MAPK E TLR/MyD88 alteradas pelo 5-fluorouracil / Priscilla Fernanda Campos Justino. – 2016.

171 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.

1. Doenças Inflamatórias Intestinais. 2. Antineoplásicos. 3. Probióticos. 4. Fluoruracila. 5. Saccharomyces boulardii. I. Título.

CDD 615.1

PRISCILLA FERNANDA CAMPOS JUSTINO

***Saccharomyces boulardii* INTERFERE NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO
CELULAR NF-KB, MAPK E TLR/MYD88 ALTERADAS PELO 5-
FLUOROURACIL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor (a) em Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profª. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará - UECE

*Agradeço especialmente a **Deus** e a **Nossa Senhora** por
sempre guiarem meus caminhos e por todas as graças
alcançadas na minha vida.*

*Agradeço muito aos meus pais, **Marcos e Daisy** (in memoriam),
Às minhas irmãs, **Carinne e Rachel**, e, ao meu noivo, **William Xavier**,
pelo amor e pelo incentivo constante e, por serem a base de tudo para mim.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmãs e amigos pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.

*Ao meu noivo **William Xavier** por todo o apoio, compreensão, paciência e estímulo que me foi dado durante todo esse processo.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. **Pedro Marcos Gomes Soares** pela orientação científica e pessoal, pela paciência e dedicação que foram de extrema importância para o meu crescimento como pesquisadora e para o meu crescimento pessoal e, por ter sempre acreditado em mim, muitas vezes mais do que eu mesma acreditava. Não tenho palavras para agradecer as horas dispensadas na minha orientação e o incentivo que sempre me foi dado.*

*Ao Prof. Dr. **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro** (in memorian), agradeço a oportunidade de participar da equipe de grandes pesquisadores do LAFICA, por ter acreditado em mim, pelo exemplo de competência e amor ao que fazia e, por ter se tornado um grande amigo e um “anjo” na vida da minha família.*

*Ao Prof. Dr. **Marcellus Loiola Souza** por ter sido o primeiro a acreditar no meu potencial e por ter me dado a chance de iniciar a minha carreira de pesquisadora, por todas as palavras de incentivo e por ser um exemplo de dedicação à pesquisa.*

*À Dra. **Dorota Czerucka**, por ter me acolhido tão bem em seus laboratórios, C3M (Nice-FR) e CSM (Mônaco), por ter incentivado a minha pesquisa, pela grande paciência e momentos de dedicação à leitura e análise dos meus dados, sempre me incentivando.*

*Ao técnico **Rodolphe Pontier** (França) por ter me ensinado e me acompanhado nos experimentos laboratoriais.*

*Aos professores **Ricardo de Freitas e Emmanuel Prata**, pelos ensinamentos repassados.*

*A Professora Dra. **Silvia Guatimosim** que me acolheu e ajudou em Belo Horizonte para realização dos experimentos em seu laboratório, no departamento de fisiologia e biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.*

*À Professora Dra. **Antoniella Souza Gomes Duarte**, à Prof. Dra. **Cibele Carvalho** por fazerem parte da minha banca de qualificação.*

A todos os outros professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que contribuíram de alguma forma para a minha formação no doutorado.

*Aos meus amigos e colegas da pós-graduação do laboratório LEFFAG e NEMPI, **Álvaro Xavier, Cecília Mendes, Marcelo Filgueiras, Danielle Foschetti, Luana Eschholz, Josy, Deysen, Samara, Marielle, Kaira, Marcos, Tiago, Ronaldo e Patrícia**, os quais se disponibilizaram a me ensinar e me ajudar nas realizações dos experimentos e, em todo decorrer do trabalho. Pelas horas de descontração, pelas conversas paralelas e por tornarem o trabalho mais divertido.*

*Em especial, aos meus grandes amigos e colegas de laboratório, **Álvaro e Cecília**, por sempre me incentivarem a seguir o caminho certo e por me apoiarem em todos os momentos profissionais e pessoais, por serem grandes amigos que quero levar para sempre na minha vida.*

*Aos bolsistas, estudantes de iniciação científica do Laboratório LEFFAG, **Athayde, e Pedro Almir** por toda a ajuda nos experimentos, nas apresentações e por todos os bons momentos passados no laboratório.*

*À colega e amiga **Josianne** (NEMPI) por me ajudar e me aguentar em todos os experimentos, mesmo eu sempre estando correndo contra o tempo, ela sempre dava um jeito de me ajudar.*

*À técnica, **Maria Silvandira França Pinheiro (Vandinha)**, pela atenção, disponibilidade, organização do laboratório LAFICA. À **Socorro** pela grande ajuda na confecção das lâminas de histologia.*

*Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, especialmente **Laura** e a **Célia**, pela disponibilidade constante em ajudar.*

*Ao meu pai **Marcos Justino** pelo amor e dedicação, por sempre acreditar e torcer pelo meu sucesso e pelo esforço incondicional pelos meus estudos.*

*À minha mãe **Daisy Fátima** (in memoriam) que sempre esteve (e está) ao meu lado, sempre foi a pessoa que mais me incentivou a realizar os meus sonhos e, que mesmo não estando mais no mesmo plano físico que nós, não deixou de me influenciar e torcer pelo meu sucesso. Agradeço por toda a sua dedicação e amor e, por tudo que sempre me ensinou, por ser responsável pelo que sou hoje.*

*Às minhas irmãs **Rachel Fátima (Kelzinha)** e **Carinne Justino**, por me ajudarem a realizar esse sonho e me apoiarem nos estudos.*

*Ao meu noivo **William Xavier** que me apoiou muito nos últimos anos do doutorado, me dando forças para continuar e me ajudando nos momentos mais complicados.*

*Ao meu avô **Antônio Justino** que mesmo distante sempre me incentivou e se realizou com as minhas conquistas.*

*Aos meus amigos **Nilton Dantas**, **Rafael Ary**, **Erica Leandro**, **Aline Mascarenhas**, **Denise Neiva**, **Júlia**, **Célia**, **Beatriz** que estão presentes no meu dia a dia, me apoiando, me ajudando nas horas difíceis. Sou muito grata por saber que os tenho como amigos a qualquer hora.*

*Às minhas “Kikis”, **Cristiane Feijó**, **Virna Saraiva**, **Marília Machado**, **Fabricia Maia**, **Maria das Graças (Gracinha)**, **Aretha Justo**, **Cláudia Lopes** e **Cláudia de Souza** por sempre me incentivarem muito, acreditando muito no meu potencial e por me proporcionarem momentos de muita alegria e descontração.*

*À Dra. **Rosângela Porto** por ter me proporcionado serenidade e confiança no decorrer do meu doutorado.*

*À amiga **Nara Pratta** por todos os momentos que passamos juntas de angústia e felicidade enquanto realizávamos nosso doutorado-sanduiche na França e, ao meu amigo **Wilson Lima** que foi essencial para a minha estadia em Nice-FR, obrigada pelas conversas, vinhos e discussões filosóficas.*

À Funcap e CAPES pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram em alguma etapa da execução do meu trabalho.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

*"Ninguém pode conhecer o que não estuda, nem
reter qualidades que não adquiriu."*

André Luiz

RESUMO

Introdução: A mucosite induzida por antineoplásicos é um fator limitante na terapia anticâncer. O trato gastrointestinal é vulnerável por causa da alta proliferação e frequência de renovação celular. *Saccharomyces boulardii* (SB) é uma levedura probiótica que é utilizada para proteger a microflora gastrointestinal do desequilíbrio e de distúrbios gastrointestinais associados. **Objetivos:** Avaliar o efeito do tratamento com SB na resposta inflamatória e nas vias de sinalização celular (NFkB e MAPK) e nos receptores Toll-like 2 e 4 associados a proteína adaptadora (MyD88) no curso da mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU. **Métodos:** Camundongos machos Swiss (25-30g) foram tratados com 5-FU (450mg/Kg, i.p.) ou com solução salina (controle). O grupo SB recebeu durante 3 dias consecutivos somente o SB (1.10^9 UFC/Kg, gavagem) até o dia do sacrifício. O grupo 5-FU+SB recebeu SB por 3 dias consecutivos após a administração do 5-FU. No 4º dia após o 5-FU ou 5-FU+SB, os animais foram sacrificados, amostras de jejuno e íleo foram retiradas e os parâmetros gerais da mucosite foram avaliados (leucograma, perda de peso, diarreia, histologia e MPO). Utilizou-se também as células Caco2 incubadas com 5-FU (1mM) e SB por 24h. Avaliou-se também a inflamação e as vias de sinalização celular, para isso avaliamos a expressão de NFkB, Ikb, MAPK (p-ERK1/2, p-p38, p-JNK), iNOS, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , CXCL1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ), receptores toll-like 2 e 4 e, MyD88. Utilizou-se os métodos de ELISA e Imunohistoquímica para as análises em tecidos animais e, utilizamos as técnicas de qPCR e de WB para as análises celulares. **Resultados:** O tratamento com 5-FU foi capaz de induzir uma lesão intestinal com um importante comprometimento da barreira epitelial funcional com a presença das seguintes alterações: encurtamento acentuado das vilosidades intestinais, necrose parcial de criptas, vacuolização de células, presença de infiltrado de polimorfonucleares, aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , CXCL1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ), aumento das concentrações de iNOS, alterações das vias celulares NF-kB e MAPK (p-ERK1/2, p-p38, p-JNK) e alteração dos receptores Toll-like 2 e 4 e de MyD88. O tratamento com 5-FU+SB reduziu significativamente as lesões intestinais, com recuperação dos vilos, recuperação da profundidade das criptas, diminuição do infiltrado neutrofílico e de iNOS, redução da concentração das citocinas pró-inflamatórias. Reduziu a alteração causada pelo 5-FU nas vias celulares NF-kB e MAPK e nas expressões de receptores TLR2 e TLR4 e de MyD88. **Conclusão:** O SB reverte a mucosite intestinal causada pelo 5-FU, com a participação de TNF- α , IL-1 β , CXCL-1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ e iNOS. O SB parece inibir as vias NF-kB e MAPK. Nossos achados, em parte, poderiam explicar os sintomas persistentes da mucosite intestinal nos pacientes sob o tratamento com 5-FU, além de contribuir para o entendimento dessa patogênese, auxiliando na descoberta de novas abordagens terapêuticas com o uso de *Saccharomyces boulardii*.

Palavras-chave: doenças inflamatórias intestinais, agentes antineoplásicos, probióticos, 5-FU, *Saccharomyces boulardii*.

ABSTRACT

Introduction: Intestinal mucositis is a frequent side-effect associated to 5-fluorouracil (5-FU) clinical use and results in inflammatory events. It is characterized by epithelial ulcerations in the mucosa and clinical manifestations of abdominal pain, nausea and diarrhea. *Saccharomyces boulardii* is a probiotic yeast which has been shown to protect the gastrointestinal microflora from disequilibrium and from associated gastrointestinal disorders. **Aim:** To evaluate the effect of treatment with SB in the inflammatory response and in cellular signaling pathways (MAPK and NFkB) and Toll-like receptors 2 and 4, and associated adapter protein (MyD88) in the course of experimental intestinal mucositis induced by 5-FU. **Methods:** Male Swiss mice (25-30g) were treated with 5-FU (450 mg / kg, i.p.) or saline (control). The SB group received for 3 consecutive days only the SB ($1,10^9$ CFU / kg, gavage) until the day of sacrifice. 5-FU group received 5-FU+SB for 3 consecutive days after administration of 5-FU. On the 4th day after 5-FU or 5-FU + SB, the animals were sacrificed, samples of jejunum and ileum were removed and the general parameters of mucositis were evaluated (WBC, loss of weight, diarrhea, histology and MPO). It also used the Caco2 cells treated with 5-FU (1mM) and SB for 24h. We also evaluated the inflammation and cellular signaling pathways, for that evaluate the expression of NFkB, Ikb, MAPK (p-ERK1 / 2, p38-p, p-JNK), iNOS, inflammatory proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , CXCL1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ), toll-like receptors 2 and 4 and MyD88. Immunohistochemistry and ELISA methods were used for the analysis in animal tissues and used qPCR techniques and WB for cell analysis. **Results:** Treatment with 5-FU was able to induce intestinal injury with a significant impairment of epithelial barrier function in the presence of the following changes: severe shortening of the villus, crypts of partial necrosis, vacuolization of cells, infiltration and mono polymorphonuclear, increased concentration of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , CXCL1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ), increased expression of iNOS, changed c expressions of NF-kB and MAPK (p-ERK1 / 2, p38-p, p-JNK) cellular pathways and changed the toll-like receptors 2 and 4 and MyD88. However, treatment with SB significantly reduced intestinal lesions, recovery of the villi, the crypt depth recovery, decreased neutrophil infiltration and iNOS, reducing the concentration of pro-inflammatory cytokines. Reversed the changes caused by 5-FU in cellular pathways NF-kB and MAPK and expressions of TLR2 and TLR4 receptors and MyD88.

Keywords: inflammatory bowel diseases, antineoplastic agents, probiotics, 5-FU, *Saccharomyces boulardii*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|---|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| γ | Gama |
| μL | Microlitro |
| μM | Micrômetro |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| 3D | Três dias |
| mM | Mili molar |
| AGCC | Ácido graxo de cadeia curta |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| ATV | Atorvastatina |
| BHI | Brain Heart Infusion |
| BN52021 | Inibidor do receptor de PAF |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| C | Controle |
| Caco2 | Célula de adenocarcinoma de cólon retal humano |
| CADS | Síndrome dispéptica associada à quimioterapia do câncer |
| cAMP | Monofosfato de adenosina cíclico |
| Célula M | Célula intestinal Microfold |
| CEPA | Comissão de ética de pesquisa animal |
| CCRm | Câncer colorretal metatático |
| Cm | Centímetro |

| | |
|--------|--|
| COX-2 | Ciclooxigenase 2 |
| CPT-11 | Cloridrato de irinotecano |
| CXCL1 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 |
| CXCR2 | Receptor de quimiocina |
| d | Dia |
| DAB | 3,3 diaminobenzidina-peróxido |
| DAMP | Padrões moleculares associados ao dano |
| DPBS | Dulbecco's phosphate buffered saline |
| DHFU | Diidrofluorouracila |
| DMEM | Dulbecco Vogt modified Eagle |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPD | Diidropirimidina desidrogenase |
| DSS | Sódio dextrana sulfato |
| DTNB | Ácido 5,5-ditiobis-2-nitro-benzóico |
| ECL | Western blotting detection reagents |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| EPM | Erro padrão da média |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FdUDP | Difosfato de Fluordeoxiuridina |
| FdUMP | Fluorodioxuridina monofosfato |
| FdUTP | Fluorodioxuridina trifosfato |
| FUDR | Fluordeoxiuridina |
| FUMP | Monofosfato de Fluoruridina |
| FUTP | Fluorouridina trifosfat |

| | |
|--------------------------------|---|
| G | Grama |
| GSH | Glutathiona |
| GM-CSF | Granulocyte macrofage colony stimulating factor |
| HTAB | Hexadecitrimetilamônio |
| H ₂ O | Água |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| ICAM-1 | Molécula de adesão intercelular 1 |
| IFN | Interferon |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IL- | Interleucina |
| IκB | Proteína inibitória de Kappa B |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IRF | Regulador de Interferon |
| IFN | Interferon |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| KCL | Cloreto de potássio |
| Kg | Quilograma |
| LBP | LPS-binding protein |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LRR | Repetições ricas em leucina |
| M | Molar |
| MAPK | Proteínas quinases ativadas por mitógeno |
| MAPKKK | Proteínas quinases quinases quinases |
| MAKK | Proteínas quinases quinases |

| | |
|------------------------------|---|
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein 1 |
| Min. | Minutos |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| mm ³ | Milímetro cúbico |
| mM | milimolar |
| MMP | Matrix metalloproteinases |
| MPO | Mieloperoxidase |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MyD88 | Fator de diferenciação Mielóide 88 |
| n | Número |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NF-KB | Fator nuclear Kappa B |
| NO | Óxido nítrico |
| NOD | Nucleotide binding oligomerization domain |
| NO ₂ ⁻ | Nitrito |
| NO ₃ ⁻ | Nitrato |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| NOSi | Óxido nítrico sintase induzida |
| NP-SH | Grupo sulfidrílico não-protéico |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PAF | Fator de ativação plaquetária |
| PAMP | Pathogen associated molecular pattern |
| PARP | Poly (ADP-ribose) polymerase |
| PBS | Solução tamponada de fosfato |

| | |
|-------|---|
| Pg | Picograma |
| PG | Prostaglandina |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| PGI2 | Prostaglandina I2 |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PLA2 | Fosfolipase 2 |
| PMN | Polimorfonucleares |
| PPAR- | Peroxisome proliferator activated receptor |
| PRR | Receptores de reconhecimento padrão |
| PTX | Pentoxifilina |
| qPCR | Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| Rel- | Família Relish |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RPM | Rotação por minuto |
| SAIF | Fator anti-inflamatório <i>Saccharomyces</i> |
| SAPK | Stress activated protein kinase |
| SB | <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| SbS | Sobrenadante de <i>Saccharomyces boulardii</i> |
| sIgA | Imunoglobulina A secretória |
| s.c. | Subcutânea |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TF | Fator de transcrição |
| TGF- | Fator de crescimento transformador |
| TGI | Trato gastrintestinal |
| TICAM | Toll interleukin 1 receptor containing adapter molecule |

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| TLD | Talidomida |
| TLRs | Receptores toll-like |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral α |
| TRIS | Tampão tris-hidroximetilaminometano |
| TP | Timina fosforilase |
| TS | Timidilato sintase |
| TXA2 | Tromboxano A2 |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| VF | Vermelho de fenol |
| v.o. | Via oral |
| WB | Western blotting |
| WHO | Organização Mundial de Saúde |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|-----------|
| FIGURA 1 | Estrutura do Intestino..... | 34 |
| FIGURA 2 | Micrografia eletrônica do <i>Saccharomyces boulardii</i> | 40 |
| FIGURA 3 | Diferentes mecanismos de ação do <i>Saccharomyces boulardii</i> (SB) no trato intestinal | 42 |
| FIGURA 4 | Estrutura química do 5-Fluorouracil | 45 |
| FIGURA 5 | Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil | 46 |
| FIGURA 6 | Fases Fisiopatológicas da Mucosite Gastrintestinal..... | 49 |
| FIGURA 7 | Ativação do fator de transcrição NF-kB..... | 51 |
| FIGURA 8 | Esquema mostrando a sinalização celular via cascata das MAP quinases ERK, JNK e p38..... | 54 |
| FIGURA 9 | Ligantes específicos para receptores Toll-like | 57 |
| FIGURA 10 | Vias de Sinalização dos receptores Toll-like..... | 59 |
| FIGURA 11 | Esquema da indução da mucosite por 5-Fluorouracil e tratamento com <i>Saccharomyces boulardii</i> em camundongos..... | 80 |
| FIGURA 12 | Esquema do protocolo experimental em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil na presença ou não de <i>Saccharomyces boulardii</i> | 81 |
| FIGURA 13 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na variação de peso corporal nos grupos experimentais | 90 |
| FIGURA 14 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na diarreia nos grupos experimentais..... | 91 |

| | | |
|------------------|---|------------|
| FIGURA 15 | Fotomicrografias de amostras do jejuno após a administração de <i>Saccharomyces boulardii</i> na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos..... | 93 |
| FIGURA 16 | Fotomicrografias de amostras do íleo após a administração de <i>Saccharomyces boulardii</i> na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos..... | 94 |
| FIGURA 17 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na infiltração neutrofílica causada na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos..... | 95 |
| FIGURA 18 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de NF-kB nos segmentos do Jejuno e Íleo imunomarcados de camundongos incubados com 5-FU..... | 97 |
| FIGURA 19 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de NFkB em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 99 |
| FIGURA 20 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> nos níveis de mRNA para IκB em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 100 |
| FIGURA 21 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de TNF-α em camundongos após a administração de 5-FU e, os níveis de mRNA para TNF-α em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 102 |
| FIGURA 22 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de IL-1β em camundongos após a administração de 5-FU e, os níveis de mRNA para IL-1β em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 104 |
| FIGURA 23 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de CXCL-1 em camundongos, após a administração de 5-FU..... | 105 |
| FIGURA 24 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> nos níveis de mRNA para IL-8, em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 106 |

| | | |
|------------------|--|------------|
| FIGURA 25 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> nos níveis de mRNA para IL-4, IL-6, IL-12 e IFN- γ , em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil.. | 107 |
| FIGURA 26 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de iNOS nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil | 109 |
| FIGURA 27 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> nos níveis de mRNA para iNOS, em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 111 |
| FIGURA 28 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de MyD88 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil | 113 |
| FIGURA 29 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de phospho-ERK 1/2 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil..... | 116 |
| FIGURA 30 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de phospho-ERK 1/2 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 118 |
| FIGURA 31 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de phospho-P38 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil..... | 120 |
| FIGURA 32 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de phospho-P38 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 122 |
| FIGURA 33 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de phospho-JNK nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil..... | 123 |
| FIGURA 34 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de phospho-JNK em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 125 |

| | | |
|------------------|---|------------|
| FIGURA 35 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de TLR2 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil..... | 127 |
| FIGURA 36 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de TLR4 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil..... | 130 |
| FIGURA 37 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de mRNA para TLR2 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil na presença ou não de LPS..... | 132 |
| FIGURA 38 | Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na expressão de mRNA para TLR4 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil na presença ou não de LPS..... | 133 |
| FIGURA 39 | Hipótese do Mecanismo de ação do <i>Saccharomyces boulardii</i> | 145 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| TABELA 1 | <i>Saccharomyces boulardii</i> não altera a leucopenia induzida por 5-FU..... | 91 |
|-----------------|---|-----------|

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| QUADRO 1 | Receptores Toll-like e seus principais ligantes | 61 |
| QUADRO 2 | Anticorpos | 77 |
| QUADRO 3 | Primers..... | 78 |
| QUADRO 4 | Grupos Experimentais..... | 79 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 31 |
| 1.1. Epitélio Intestinal | 32 |
| 1.2. Microbiota Gastrintestinal | 36 |
| 1.3. Probióticos | 37 |
| 1.4. A Levedura <i>Saccharomyces boulardii</i> | 38 |
| 1.5. O Câncer | 43 |
| 1.6. 5-Fluorouracil (5-FU)..... | 44 |
| 1.7. Mucosite Gastrintestinal | 47 |
| 1.8. As Vias de Sinalização Celular | 49 |
| 1.8.1. O Fator de Transcrição NF-kB | 49 |
| 1.8.2. As MAP quinases | 52 |
| 1.8.3. As Citocinas | 54 |
| 1.9. MyD88 e os Receptores Toll-Like | 56 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 63 |
| 3 OBJETIVOS | 66 |
| 3.1. Objetivo Geral | 67 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 67 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 69 |
| 4.1. Animais | 70 |
| 4.2. Aspectos Éticos | 70 |
| 4.3. Cultura Celular | 70 |

| | |
|--|-----------|
| a) Tripsinização e contagem das células | 71 |
| 4.4. Leveduras | 72 |
| 4.5. Aparelhos e Instrumentos Laboratorais | 73 |
| 4.6. Drogas e Soluções..... | 74 |
| 4.7. Anticorpos e Primers | 77 |
| 4.7.1 Anticorpos | 77 |
| 4.7.2. Primers | 78 |
| 4.8. Procedimento Experimental | 79 |
| 4.8.1. Grupos Experimentais | 79 |
| 4.8.2. Indução Da Mucosite Intestinal Por 5-Fluorouracil e Tratamento com <i>Saccharomyces boulardii</i> | 79 |
| a) Animal | 79 |
| b) Célula | 80 |
| 4.9. Avaliação dos Parâmetros Gerais da Indução da Mucosite por 5- Fluorouracil Tratados com <i>Saccharomyces boulardii</i> | 81 |
| a) Avaliação Ponderal | 81 |
| b) Contagem Sanguínea de Leucócitos Totais | 81 |
| c) Avaliação da Diarreia | 82 |
| d) Histopatologia do Intestino Delgado | 82 |
| e) Determinação da infiltração de neutrófilo através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) | 82 |
| 4.10. Avaliação dos Parâmetros Inflamatórios e das Vias de Sinalização Celular (NF-κB e MAPK), da proteína adaptadora MyD88 e dos receptores toll-like (TLR2 e TLR4) na Mucosite Induzida por 5- Fluorouracil Tratados com <i>Saccharomyces boulardii</i>, <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 83 |

| | |
|--|------------|
| a) Imunohistoquímica para o Fator de Transcrição NF-kB, iNOS, MAPK (phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK), MyD88, TLR2 e TLR4 | 83 |
| b) Avaliação da expressão do Fator de Transcrição NF-KB e MAPK (phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK) por eletroforese em gel de poliamida, técnica de Western Blotting em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil e/ou <i>S. boulardii</i> | 84 |
| c) Avaliação da expressão de IK-B, TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ , iNOS, TLR2 e TLR4 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil e/ou <i>S. boulardii</i> , através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) | 85 |
| d) Avaliação da expressão de Citocinas (TNF- α , IL-1 β e CXCL-1) dos segmentos intestinais dos animais tratados com 5-Fluorouracil e/ou <i>S. boulardii</i> | 86 |
| 4.11. Análise Estatística | 87 |
| | |
| 5 RESULTADOS | 88 |
| 5.1. Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> nos parâmetros gerais e inflamatórios da mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos..... | 89 |
| 5.2. Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> nas vias de sinalização celular (NF-kB e MAPK) na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos e, em células caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 96 |
| 5.3. Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na avaliação da participação da proteína adaptadora MyD88 e das proteínas MAP quinases (phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK) na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil e, em células caco2 incubadas com 5-Fluorouracil..... | 112 |
| 5.4. Efeito do <i>Saccharomyces boulardii</i> na participação dos receptores Toll-like (TLR2 e TLR4) na mucosite induzida por 5-Fluorouracil e, em células caco2 incubadas com 5-Fluorouracil | 126 |

| | | |
|---|---|------------|
| 6 | DISCUSSÃO | 134 |
| 7 | CONCLUSÃO | 147 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 149 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epitélio Intestinal

O intestino exerce funções importantes para a saúde do organismo, tais como digestão e absorção de macro e micronutrientes e produção de importantes hormônios reguladores. Pode funcionar ainda como órgão imune e agir como barreira contra agentes nocivos. O intestino é formado por três camadas básicas, a camada epitelial, a lâmina própria e a camada muscular da mucosa (DUNCAN; GRANT, 2003).

A superfície mucosa do trato gastrointestinal é a maior superfície corporal em contato com o meio externo (200 a 300 m²). Ela representa um ecossistema complexo que combina epitélio gastrointestinal, células imunes e microbiota residente (MCCRACKEN & LORENZ, 2001). A mucosa do trato intestinal está constantemente exposta a vários microrganismos patogênicos, e uma barreira física e química contra esses patógenos é criada pelo epitélio intestinal (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006). A superfície do intestino é delineada por um epitélio simples colunar que forma diversas invaginações, ou criptas, que são embebidas no tecido conectivo. As células epiteliais intestinais formam uma barreira física que protege o hospedeiro contra uma infecção patogênica (LOUVARD *et al.*, 1992; KEDINGER *et al.*, 1998; MONTGOMERY *et al.*, 1999). O epitélio intestinal representa um modelo de renovação tissular, uma vez que as células intestinais são constantemente geradas de células tronco multipotentes localizadas nas criptas de Lieberkühn, o que gera novas células precursoras permitindo uma alta taxa de renovação (“turnover”) celular. Nas vilosidades intestinais, as células epiteliais polarizadas que formam o epitélio separam dois diferentes compartimentos. Essa barreira epitelial é formada por quatro linhagens de células epiteliais diferentes, incluindo (i) os enterócitos, que expressam na parte apical uma densa e ordenada borda em escova, que consiste de microvilosidades organizadas na membrana; (ii) as células enteroendócrinas, contendo pequenos grânulos com diversos peptídeos hormonais; (iii) as células caliciformes, responsáveis pela produção de muco; e (iv) as células de Paneth, com grânulos apicais contendo peptídeos e proteínas antimicrobianos. Somado a isso, ainda existem as células M (“microfold”) - que são células epiteliais especializadas, localizadas no epitélio folicular associado, que estão sobre o tecido linfóide - presentes no epitélio associado ao folículo (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

A morfogênese e a diferenciação do intestino requerem um “cross-talk” entre o epitélio e as células mesenquimais. Inicialmente, uma onda de diferenciação proximal-distal muda o

epitélio pseudoestratificado para uma camada colunar simples de células epiteliais indiferenciadas. Logo após, a diferenciação celular ocorre como células epiteliais originadas de células tronco multipotentes na base das criptas de Lieberkühn, que são os locais de proliferação de células epiteliais (CHENG & LEBLOND, 1974; FALK *et al.*, 1998). As células de Paneth migram para a base da cripta do intestino delgado, enquanto os outros tipos celulares migram da cripta para as vilosidades do intestino delgado. As células colunares, também conhecidas como enterócitos, no intestino delgado, ou colonócitos, no intestino grosso, compreendem mais de 80% de todos os tipos celulares. As células caliciformes estão presentes em todo o intestino, mas aumentam em densidade da porção proximal para a distal. As células enteroendócrinas, com o sistema nervoso sistêmico, estão dispersas em todo o intestino (FURNESS *et al.*, 1999). As células epiteliais intestinais possuem um ciclo de vida de, aproximadamente, 2-5 dias e, durante a morte, são exfoliadas, junto com as bactérias aderentes, o que auxilia na eliminação de patógenos. As células de Paneth possuem uma vida maior, sobrevivendo por mais de 20 dias, ao final dos quais são fagocitadas.

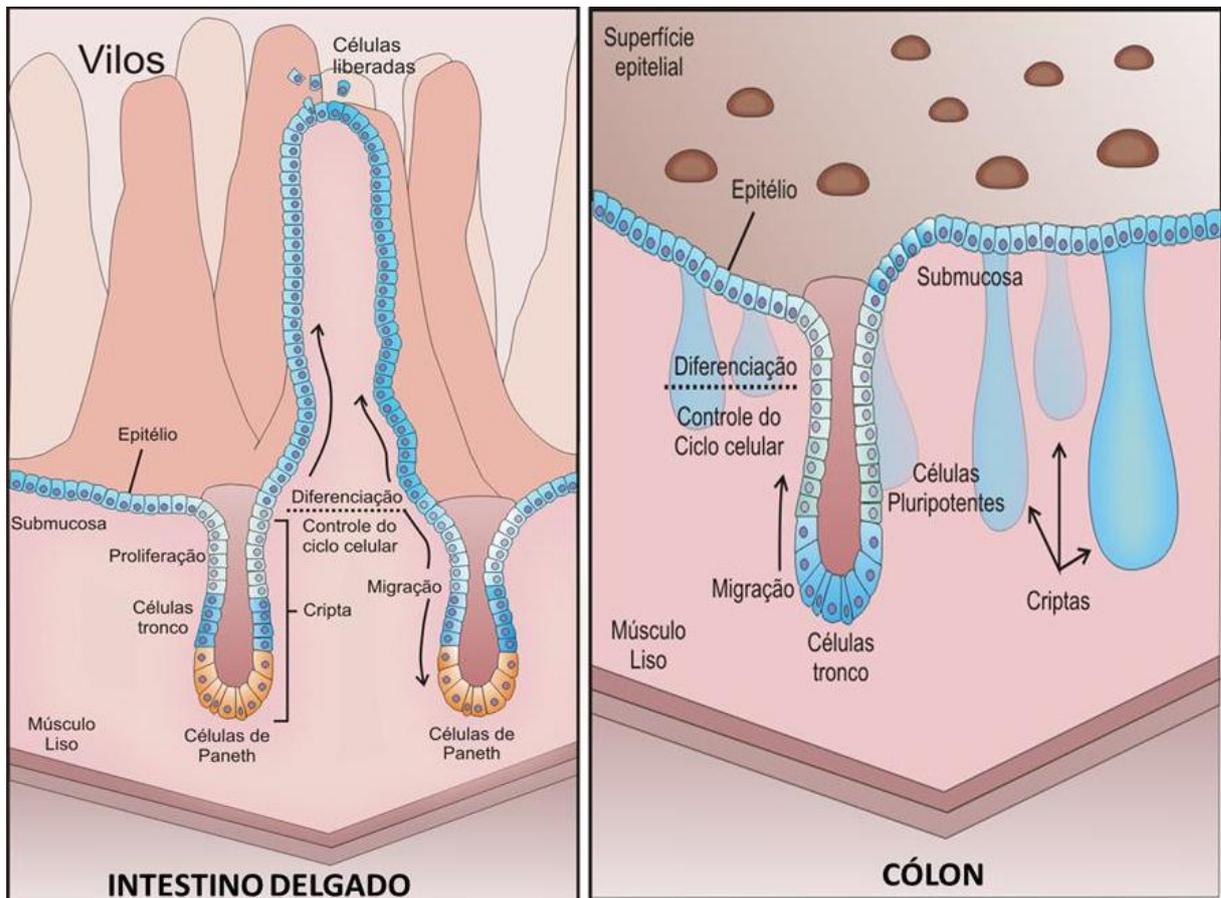


FIGURA 1 – Estrutura do Intestino. Fonte: Adaptado de SANCHO, BATTLE, CLEVERS, 2004. *Nat Rev Cell Dev Biol*, 20:695-723, 2004. Painel **Painel A**: Estrutura do intestino delgado. **Painel B**: Estrutura intestino grosso.

As células epiteliais do intestino protegem o hospedeiro fornecendo uma forte barreira física e, também, pela produção de uma variedade de substâncias antimicrobianas. (BINES & WALKER, 1991). As células epiteliais secretam diversas substâncias como muco, defensinas e substâncias antimicrobianas, que inibem o crescimento bacteriano e protegem o epitélio, prevenindo a adesão microbiana e mantendo as substâncias antimicrobianas e os anticorpos secretados na superfície epitelial (MAGNUSSON & STJERNSTROM, 1982; OUELLETTE, 1999). Somado a isso, as células epiteliais secretam diversas citocinas e quimiocinas, incluindo IL (interleucina)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 (“monocyte chemoattractant protein 1”), GM-CSF (“granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”), TNF- α (“tumor necrosis factor a”) e TGF- β (“transforming growth factor b”) (MCCRACKEN & GASKINS, 1999).

O sistema de defesa do hospedeiro contra patógenos entéricos inclui imunidade adaptativa e imunidade inata. A resposta imune adaptativa é observada 4 a 7 dias após a infecção, e esse mecanismo envolve a geração de memória imunológica e a expansão de receptores com especificidade relevante. Em contraste, o sistema imune inato é mobilizado nos primeiros dias para controlar a infecção (MEDZHITOV, 2001). O epitélio intestinal fornece uma superfície onde o hospedeiro pode “sentir” o ambiente microbiano e ativar uma resposta potente pela liberação de moléculas sinalizadoras, como as citocinas e as quimiocinas, e essas recrutam leucócitos e iniciam a atração de células imunes. Entretanto, o epitélio intestinal, ao contrário do epitélio pulmonar, tolera a colonização bacteriana e, embora exposto a bactérias comensais, a mucosa intestinal exhibe apenas uma inflamação mínima em resposta aos componentes da microbiota normal, incluindo bactérias Gram-positivo e Gram-negativo. Esses produtos incluem componentes celulares, como o lipopolissacáride (LPS) de bactérias Gram-negativo e lipoproteínas e peptidoglicanos de bactérias Gram-positivo. O intestino do hospedeiro distingue a microbiota normal dos microrganismos enterovirulentos, utilizando sistemas altamente sofisticados de detecção de antígenos (DIDIERLAURENT *et al.*, 2002; ATHMAN & PHILPOTT, 2004; ALDRIDGE *et al.*, 2005). As bactérias indígenas da microbiota compartilham moléculas “self” (ou próprias), conhecidas como motivos moleculares associados a micróbios.

Em contraste, após uma infecção, a resposta imune inata da mucosa do hospedeiro é ativada como um resultado do reconhecimento específico por receptores de reconhecimento padrão de estruturas moleculares “non self” encontradas em vários grupos de patógenos, conhecidas como motivos moleculares associados a patógenos, PAMP (“pathogen-associated molecular pattern”) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). Por exemplo, as células epiteliais “sentem” o ambiente dentro do intestino, via receptores de reconhecimento, que incluem os receptores Toll-like (TLRs) e as proteínas NOD (“nucleotide-binding oligomerization domain”) (JANSSENS & BEYAERT, 2003; NETEA *et al.*, 2004; PHILPOTT & GIRARDIN, 2004; ECKMANN, 2005; KAWAI & AKIRA, 2005).

Em síntese, o epitélio intestinal não é apenas uma barreira física que previne os patógenos de ganharem acesso aos órgãos, ele também fornece uma superfície coberta de células especializadas na produção de muco, de peptídeos antimicrobianos e moléculas, como a lisozima que, juntos com a microbiota residente e o sistema imune, fornecem uma linha de defesa contra microrganismos patogênicos (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

1.2. Microbiota Gastrintestinal

O termo microbiota tem sido usado para descrever a coleção de bactérias abrigadas nas mucosas de um indivíduo (SAVAGE, 1977). O trato gastrintestinal (TGI) dos mamíferos abriga uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, composta por 10^{14} unidades formadoras de colônias (UFCs) de microrganismos, número dez vezes maior que o de células do hospedeiro. Estima-se que o número de espécies bacterianas do trato gastrintestinal gire em torno de 400, embora outros estudos indiquem que esse número varia de 500-1000 espécies (MARTINS *et al.*, 2009).

Normalmente no estômago e duodeno encontramos $< 10^3$ células bacterianas por grama de conteúdo estomacal e duodenal, predominantemente os microorganismos mais encontrados são os lactobacilos e estreptococos e, devido às secreções ácidas, biliares, e pancreáticas ocorre a supressão da maioria dos microrganismos ingeridos diariamente. No jejuno e íleo o número de bactérias aumenta progressivamente de 10^4 células no jejuno a 10^7 células por grama de conteúdo no íleo e no intestino grosso encontramos um ambiente densamente povoado por anaeróbios, 10^{12} células por grama de conteúdo luminal (SAAD, 2006).

Dentre esses microorganismos que hospedam o trato gastrintestinal a maioria são microorganismos essenciais para o bom funcionamento do organismo, mas por muitas vezes pode ocorrer à invasão de alguns microorganismos nocivos (BIELECKA, MAJKOWSKA, 2000).

É difícil definir a composição da microbiota normal em uma dada região do trato gastrintestinal, mesmo dentro de um indivíduo; não só por causa do problema para se distinguir residente de transiente, mas, também, devido à dificuldade de cultivo de muitos componentes *ex vivo*. A microbiota dominante raramente apresentará grandes diferenças entre os indivíduos adultos; entretanto, a microbiota sub-dominante e, principalmente, a residual, podem sofrer alterações devido à idade, à distribuição geográfica, à dieta, ao estresse, às mudanças hormonais, ao comportamento sexual e ao uso de antibióticos (SALMINEN *et al.*, 1995; MARSHALL, 1999; MCFARLAND, 2000b).

O estabelecimento e a manutenção da microbiota constituem um processo complexo, que pode ser influenciado por vários fatores, como dieta, idade, utilização de antibióticos, utilização de probióticos e prebióticos, ambiente, microbiota materna, via do parto, interações microbianas, interações microrganismo-hospedeiro, presença de certos genes (ou produtos gênicos ou expressão de certos genes) e receptores (MACKIE *et al.*, 1999; SAVAGE, 1999; BOURLIOUX *et al.*, 2003), além de sua sucessão ecológica, demanda nutricional e tolerância oral (VAN DER WAAIJ, 1989).

1.3. Probióticos

A palavra probiótico, *pro* (a favor) e *bio* (vida), foi citada pela primeira vez por Lilley and Stiwell em 1965 caracterizando substâncias secretadas por um microrganismo, as quais estimulavam o crescimento de outro. Porém, Metchnikoff no início do século passado já havia notado efeito benéfico em indivíduos que consumiam iogurte contendo lactobacilos (FULLER, 1992; VANBELLE et al., 1990). A definição de probiótico tem sofrido alterações conforme os avanços alcançados nas pesquisas. Em 1974 Parker reformulou o conceito de probióticos como sendo organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. As bactérias probióticas também foram definidas como bactérias viáveis, em cultura única ou mista, afetando beneficemente o hospedeiro em razão de promover a melhora das propriedades da microflora indígena (DONOHUE et al., 1998, HAVENAAR; VELD, 1992).

A definição aceita internacionalmente para probióticos é que estes são microrganismos vivos, que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; SANDERS, 2003).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002; SAAD, 2006).

Os probióticos têm sido utilizados em várias situações clínicas e condições cirúrgicas. Há evidências de que estas substâncias são amplamente benéficas. Os mecanismos pelos quais os microrganismos podem exercer efeitos benéficos e proteger contra a colite, por exemplo, incluem efeitos diretos sobre o local e a estimulação da resposta imune protetora. De fato, alguns estudos clínicos e experimentais têm mostrado que os probióticos são benéficos no tratamento da diarreia e colite ulcerativa, por exemplo (SOUZA *et al.*, 2007).

Os benefícios dos probióticos que mais se destacam são o controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, diminuição da população de patógenos através da produção de ácido acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos, promoção da

digestão de lactose em indivíduos intolerantes à lactose, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. São sugeridos também a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (SHAH, LANKAPUTHRA, 1997; CHARTERIS *et al.*, 1998; JELEN, LUTZ, 1998; KLAENHAMMER, 2001; KAUR, CHOPRA, SAINI, 2002; TUOHY *et al.*, 2003; SAAD, 2006).

Os conhecimentos sobre os efeitos potenciais dos probióticos no tratamento de enfermidades intestinais de diferentes origens, embora ampliados e fundamentados em vasta literatura médica, ainda são pouco difundidos e muitos médicos de diferentes especialidades não se aprofundaram ou mesmo desconhecem tais aspectos.

A aceitação dos probióticos como uma modalidade terapêutica aumentou dramaticamente e, a frequência de artigos de revisão e de ensaios clínicos randomizados tem mantido o interesse global nesse inovador método de terapia. Inúmeras cepas probióticas foram investigadas quanto à eficácia clínica, incluindo várias cepas de bactérias lactobacilos, bifidobactérias, estreptococos, *Clostridium* e linhagens dos fungos *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*, e *Monascus purpureus* (MCFARLAND LV, 2009; CZERUCKA D *et al.*, 2007; ELMER GW *et al.*, 1996).

1.4. A levedura *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii (SB) foi descoberto por um francês microbiologista, Henri Boulard em 1920 quando estava na Indochina à procura de novas estirpes de leveduras que poderiam ser utilizadas em processos de fermentação. Ele observou que durante um surto de cólera algumas pessoas que não desenvolveram a doença beberam um chá especial, de uma fruta tropical (*lychees, mangosteens*). Ele conseguiu isolar o agente responsável, uma linhagem especial de levedura que nomeou de "*Saccharomyces boulardii*" (ELMER *et al.*, 1996; KLEIN *et al.*, 1993).

O SB é uma espécie termotolerante do gênero *Saccharomyces*, a qual é comumente utilizada em diversos alimentos processados incluindo pães e bebidas fermentadas. Além

disso, é também frequentemente prescrito, sendo utilizado na forma liofilizada, como agente bioterapêutico (ELMER *et al.*, 1996; KLEIN *et al.*, 1993).

A partir de 1960 iniciou-se a comercialização da levedura liofilizada, pelo “Laboratoires Biocodex” (Paris, França). Em 2007 seu uso foi liberado pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos (FLORASTOR, 2007). Os direitos de comercialização para a América do Sul foram adquiridos pelas Indústrias Químicas da MERCK S.A. Além disso, outras preparações contendo *S. boulardii* estão disponíveis no Brasil (MARTINS *et al.*, 2005b).

A levedura de SB é utilizada em muitos países tanto como agente profilático quanto como agente terapêutico das diarreias e outras variações das doenças gastrintestinais, como as causadas pela administração de agentes antimicrobianos.

Segundo VAN DER & JESPERSEN (2003), as leveduras do gênero *Saccharomyces* têm demonstrado efeito probiótico. Em experimentos clínicos estas mostraram ser efetivas contra gastroenterites agudas infantis e diarreia seguida de tratamento com antibióticos e apresentaram efeito inibitório sobre *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* e *Clostridium difficile*, bem como modularam o sistema imune estimulando a produção de IgA e o sistema de fagocitose em camundongos (RODRIGUES *et al.*, 2000).

O SB apresenta propriedades que o levam a ser considerado um agente probiótico, como: (i) sobrevivência no trânsito do trato gastrintestinal (ii) crescimento ótimo a 37°C tanto in vivo quanto in vitro e (iii) capacidade de inibir um número considerável de agentes patogênicos (CZERUCKA *et al.*, 2007).

Desde 1982, ano da primeira publicação, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de esclarecer o mecanismo de ação de probióticos compostos por SB e, assim, melhor avaliar suas propriedades benéficas para o hospedeiro humano (JUSTINO PF *et al.*, 2013).

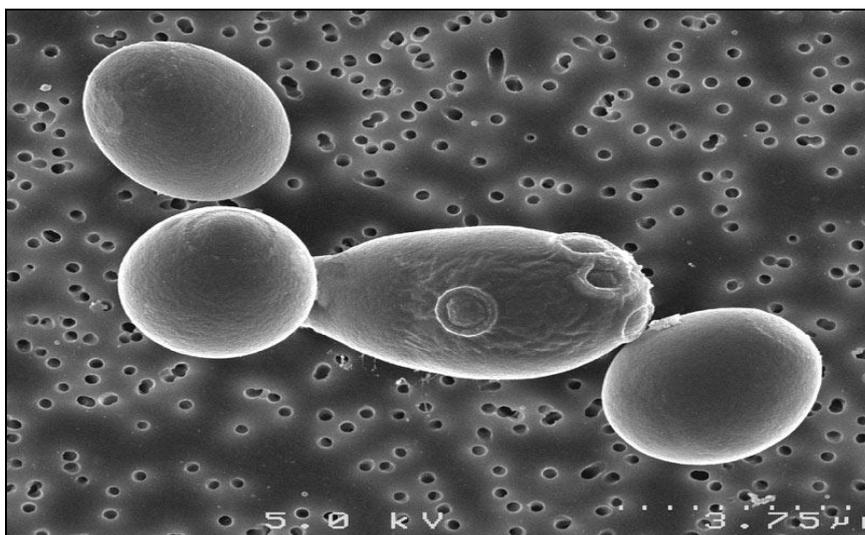


FIGURA 2 - Micrografia eletrônica do *Saccharomyces boulardii* (Dr. Sandy Smith, Dept de Ciência dos Alimentos da Universidade de Guelph, Canadá).

Embora o exato mecanismo através do qual o *SB* atua ainda não esteja completamente esclarecido, diversos mecanismos possíveis têm sido propostos (FIGURA 3), que podem ser classificados em três áreas principais: a ação na luz, ação trófica e efeitos antiinflamatórios (ELMER GW, 2007; BOIRIVANT M, STROBER W, 2007; POTHOUKAKIS C, 2009; NG SC *et al*, 2009). Esses mecanismos incluem: a inibição da adesão celular pelos enteropatógenos (GOPAL *et al.*, 2001), a manutenção da integridade da mucosa intestinal, como as junções de cadeias fechadas íntegras (RODRIGUES *et al.*, 1996), a neutralização dos fatores de virulência bacterianos (CZERUCKA *et al.*, 2001) e o aumento da resposta imune na mucosa intestinal (BRANDAO *et al.*, 1998).

SOUGIOULTZIS *et al.* (2006) mostraram que *SB* secreta substâncias anti-inflamatórias. Trabalhando com células HT-29 e THP-1, esses autores observaram que a levedura secreta um fator anti-inflamatório (<1 kDa) termo-estável, que inibe a produção de IL-8, a degradação de I κ B- α (“inhibitory protein κ B α ”) e reduz a ativação de NF- κ B em células tratadas com IL-1 β ou LPS. Observou-se, também, um efeito anti-inflamatório, pela produção de fatores solúveis de baixo peso molecular, que bloqueiam a ativação de NF- κ B e a expressão de IL-8. Segundo os autores, essas substâncias podem mediar, pelo menos em parte, os efeitos benéficos da levedura *S. boulardii* observados nas infecções intestinais. CHEN *et al.* (2006), também trabalhando com o sobrenadante da levedura (SBS), observaram que o SBS inibe a produção de IL-8 induzida pela toxina A do *C. difficile* ou IL-1 β , assim como a ativação de algumas MAP quinases. *In vivo*, demonstraram que SBS normaliza a secreção de fluidos mediada pela toxina A.

Também já foi descrito o efeito da levedura na liberação de aminopeptidases na mucosa e fluido endoluminal de camundongos (BUTS *et al.*, 2002). Foi observada a liberação de proteínas e fatores tróficos durante o trânsito intestinal, que aumentam as defesas imunes, a digestão e a absorção de nutrientes. Existem, ainda, mais de 1500 proteínas não estudadas, que poderiam ser liberadas pela levedura durante seu trânsito intestinal (BUTS & DE KEYSER, 2006).

LEE *et al.* (2005) observaram que *SB* possui um efeito anti-inflamatório via PPAR-gamma (“peroxisome proliferator-activated receptor-gamma”), uma molécula que regula a inflamação no epitélio intestinal. Eles observaram que a levedura aumenta a expressão de PPAR-gamma nos níveis de mRNA e proteína, e que ela inibe o efeito de TNF- α , IL-1 β ou LPS na diminuição da expressão de PPAR-gamma. Outros trabalhos sugerem um outro mecanismo de ação da levedura, envolvendo uma possível inibição da produção de óxido nítrico pela levedura (GIRARD *et al.*, 2003; GIRARD *et al.*, 2005a). Utilizando animais SCID (“immunoincompetent syngenic severe combined immunodeficiency”), DALMASSO *et al.* (2006a) demonstraram que *S. boulardii* interfere no processo inflamatório, devido a uma alteração específica no comportamento de migração de células T que se acumulam nos linfonodos mesentéricos, e que o tratamento com essa levedura limita a infiltração de células Th1 no cólon inflamado e a amplificação da inflamação induzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias.

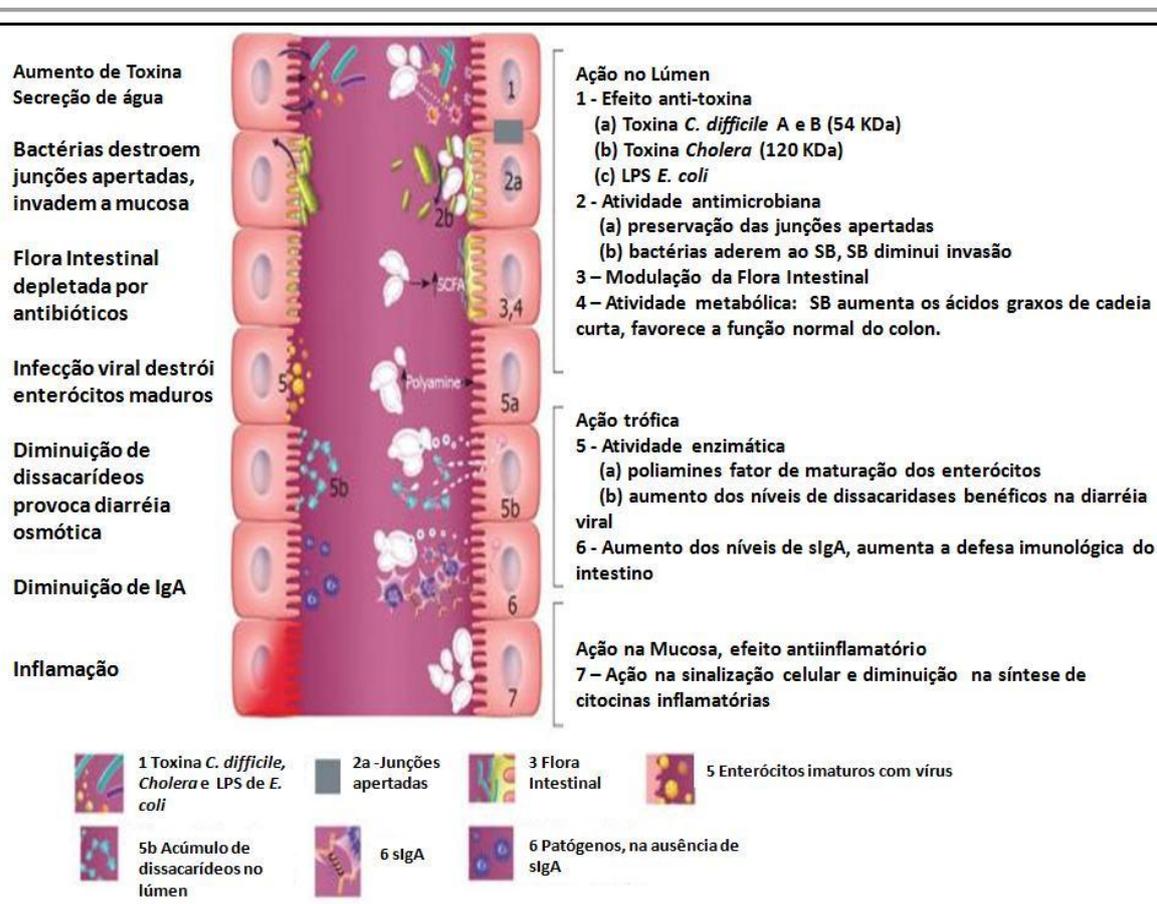


FIGURA 3 - Diferentes mecanismos de ação do *Saccharomyces boulardii* (SB) no trato intestinal (McFarland, 2010).

A dose de ataque de *S. boulardii* é um fator importante no tratamento. Vale ressaltar que para a efetividade dos diferentes mecanismos de ação do SB, quantidades significativas desse microrganismo viável devem estar presentes nas doses administradas para a potencialização dos efeitos benéficos. Considera-se que esse microrganismo poderá agir no ecossistema somente quando sua população apresentar concentrações iguais ou superiores a 10^7 células viáveis/g do conteúdo e a manutenção da atividade metabólica. Portanto, na preparação inicial comercializada, deve-se contabilizar a concentração de células viáveis que atinja os valores citados quando no conteúdo intestinal. Dessa forma, estima-se que a concentração de células viáveis na composição de produtos probióticos deve ser superior a 10^8 a 10^9 UFC/g, especialmente devido aos possíveis efeitos gástricos e duodenais (MARTINS *et al.*, 2005).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária licenciou uma apresentação de *Saccharomyces boulardii* que possibilita a utilização de doses mais elevadas na fase inicial da gastroenterite (três cápsulas de 250 mg - 100 mg de liofilizado contém no mínimo $0,5 \times 10^9$ células de *Saccharomyces boulardii*) no primeiro dia, seguidos de uma posologia mais baixa

nos dias subsequentes (duas cápsulas de 200 mg no segundo dia e uma cápsula de 200 mg no terceiro dia). Vale ressaltar que vários trabalhos comprovam a eficácia e segurança de doses aumentadas de *S. boulardii* no tratamento da diarreia aguda de diferentes etiologias (HTWE *et al.*, 2008, SZAJEWSKA *et al.*, 2007, VILLARRUEL *et al.*, 2007, HAFEEZ *et al.*, 2002).

SB quando administrado por via oral, atinge concentrações de estado estacionário no prazo de três dias e é eliminado de 3-5 dias após sua suspensão (GRAFF S *et al.*, 2008; ELMER GW *et al.*, 1999). A possibilidade de translocação de *SB* no interior do intestino é, praticamente, inexistente, uma vez que a levedura não coloniza o cólon (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993). A ingestão ocorre por via oral e, nestas condições, a levedura é insensível à ação dos sucos digestivos e de antibacterianos (BLÉHAUT *et al.*, 1989; BODDY *et al.*, 1991). A administração da levedura deve ser realizada de maneira repetida e regular, pois ela não se implanta no tubo digestivo, embora seja capaz de atingir, rapidamente, altas concentrações no cólon (FULLER, 1992). Dois a cinco dias após a descontinuação do seu uso, ela não é mais encontrada nas fezes (BLÉHAUT *et al.*, 1989).

1.5. O Câncer

O câncer é um conjunto de mais de cem doenças que tem em comum um crescimento desordenado de células malignas, sendo no momento, a segunda causa de óbito no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 27 milhões de casos novos de câncer no mundo em 2030, com uma expectativa de 17 milhões de mortes e 75 milhões de sobreviventes a esta doença. Assim, nas últimas décadas, esta doença tornou-se um problema de saúde pública mundial. Estima-se, ainda, que o câncer, já a partir de 2020, tornar-se-á a doença com a maior taxa de mortalidade, superando as doenças cardiovasculares (WHO, 2013). No Brasil, para o ano de 2016/2017, tivemos uma estimativa de incidência aproximada de 596 mil casos de câncer, sendo 300.800 casos novos para o sexo feminino e 295.200 para o sexo masculino (INCA, 2016).

O impacto destas estatísticas é parcialmente amenizado quando ressaltamos os importantes avanços terapêuticos na última década que prolongaram substancialmente a sobrevida dos pacientes portadores desta grave neoplasia. Como por exemplo, a quimioterapia paliativa aumenta a sobrevida global, a sobrevida livre de progressão e a qualidade de vida nos pacientes com o câncer colo-retal metastático (CCRm) (PESSINO, SOBRERO, 2006).

Por mais de 40 anos, a quimioterapia baseada em 5-Fluorouracil (5-FU) era o único tratamento com atividade no CCRm. No entanto, durante os últimos 10 anos, uma série de drogas tem demonstrado atividade para o CCR metastático. Oxaliplatina combinada com 5-FU/leucovorin bimensal mostrou ser superior a 5-FU/leucovorin em termos de taxa de resposta, sem ter um impacto negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes (De GRAMONT *et al.*, 2000).

Goldberg e Gill (2004) mostraram que a combinação de 5-FU com o irinotecano apresentou taxas de resposta de aproximadamente 55% com uma sobrevida mediana de 22 meses. No entanto, no mesmo estudo, a mortalidade associada ao regime com fluorouracil em *bolus*, exigia cautela e motivou a investigação por um comitê independente para identificar os motivos que teriam causado este problema. E, suas conclusões apontaram para a alta frequência de uma síndrome de toxicidade gastrointestinal.

Dentro das abordagens para o tratamento do câncer, a quimioterapia pode ser utilizada como uma terapia propriamente dita ou como adjuvante de outras formas de tratamento (DALE, 2008).

1.6. 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-FU é uma droga antimetabólica da classe das fluoropirimidinas que foi desenvolvida a partir da década de 50, com o objetivo de inibir processos essenciais, como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, processo essencial para síntese e metabolismo de novas células. (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954).

O 5-FU é um análogo da uracila adicionado a uma molécula de flúor na posição C-5 (FIGURA 3). No meio intracelular, é convertido em vários metabólitos. Esses são metabólitos ativos que interferem na síntese de RNA e na ação da timidilato sintase (TS).

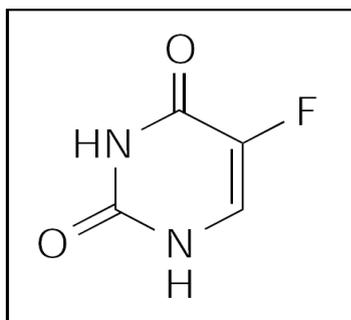


FIGURA 4 - Estrutura química do 5-Fluorouracil (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

5-Fluorouracil pode ser convertido em três metabólitos ativos, são eles: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluoruridina (FUTP). O mecanismo de ativação do 5-FU se dá pela conversão em monofosfato de fluoruridina (FUMP), que é então fosforilada em difosfato de fluoruridina (FUDP), que pode ser fosforilada no metabólito ativo, o trifosfato de fluoruridina (FUTP), ou pode ser convertido em difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUDP). Esse composto intermediário do metabolismo de 5-FU pode ser fosforilado ou defosforilado dando origem aos metabólitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente. Um caminho alternativo é catalisado pela timidina fosforilase (TP) que converte 5-FU em fluorodeoxiuridina (FUDR), que é então fosforilado em FdUMP pela timidina quinase. A conversão do 5-FU em diidrofluorouracil (DHFU) pela diidropirimidina desidrogenase (DPD) é a etapa limitante do catabolismo de 5-FU, tanto em células normais como em células tumorais. Em torno de 80% do 5-FU é metabolizado no fígado (LONGLY; HARKIN; JOHNSTON, 2003) (FIGURA 4).

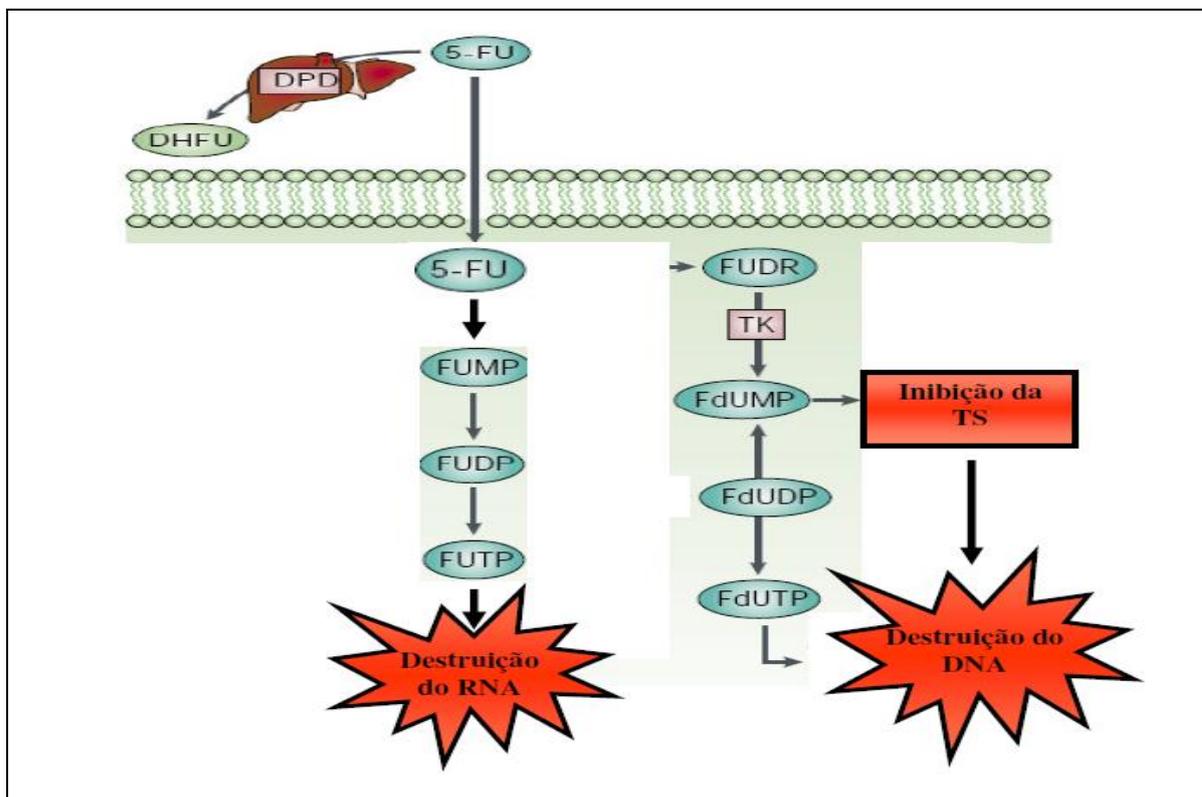


FIGURA 5 - Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil

O mecanismo de citotoxicidade atribuído ao 5-FU está na sua capacidade de incorporar fluoronucleotídeo na molécula de DNA e/ou RNA, bem como pela inibição da enzima timidilato sintase (TS). A timidilato sintase é importante no processo de fornecimento de grupos timidilatos para o reparo e síntese de DNA (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

Por ser utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama e o coloretal, sendo de maior impacto nesse último tipo. O 5-FU causa efeitos adversos que variam consideravelmente de acordo com o tratamento, dose utilizada e via de administração e são mais evidentes em células com grande índice de mitoses, como tecidos de rápida proliferação. Na medula óssea resulta em granulocitopenia e trombocitopenia, no trato gastrointestinal resulta em mucosite oral, mucosite intestinal, faringite, esofagite, gastrite, colite, entre outros (KOENIG; PATEL, 1970). Alopecia, dermatite, cardiotoxicidade e mais raramente, neurotoxicidade também são efeitos tóxicos observados na utilização do 5-FU (PIRZADA *et al.*, 2000).

A ação do 5-FU não se limita somente às células neoplásicas, com isso, essas drogas podem atuar em células normais tendo como resultado importantes efeitos colaterais que em determinadas situações podem determinar desde a redução do esquema terapêutico como a

sua total interrupção, assim, podendo trazer grande prejuízo na eficácia do tratamento oncológico.

1.7. Mucosite Gastrintestinal

Mucosite gastrintestinal é o termo clínico usado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral ou mucosa intestinal). A alta prevalência de manifestações clínicas adversas como disfagia, dispepsia, diarreia, náuseas e vômitos, dor abdominal, úlceras orais e anorretais, entre outras, são resultado da pouca seletividade dos agentes antineoplásicos e da alta taxa de proliferação do epitélio do trato gastrintestinal (GIBSON & KEEFE, 2006). A frequência relatada de mucosite oral e intestinal varia 30-40% a quase 100% (KEEFE DM *et al*, 2007). Quando se associa irradiação à quimioterapia em altas doses, a prevalência de mucosite atinge quase 100% dos pacientes, afetando mais de dois milhões de pessoas no mundo a cada ano (GIBSON *et al*, 2013).

A diarreia, um sintoma marcante na mucosite intestinal, é observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando se observa diarreia moderada a forte em até 25% dos pacientes (KEEFE *et al*. 2007).

Portanto, a mucosite gastrintestinal tem o potencial de interferir diretamente na eficácia do tratamento, aumentando os custos com a terapia e apresentando um grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes.

De acordo com uma revisão de Keefe *et al* (2007) observa-se uma maior incidência de mucosite intestinal em relação à oral, nos pacientes em tratamento para câncer de cólon, uma baixa incidência de mucosite oral e intestinal em pacientes submetidos ao tratamento de câncer de pulmão, e uma alta incidência de mucosite oral em relação à intestinal, nos regimes para tratamento de câncer de mama e linfoma.

De acordo com Sonis (2014), a mucosite oral induzida por quimioterápicos e/ou radioterápicos é classicamente dividida em cinco fases, sendo uma sequência de eventos biológicos: iniciação, resposta primária ao dano, amplificação do sinal, ulceração e, finalmente, cicatrização, e possivelmente essas fases são as mesma para a mucosite intestinal. Logo, os danos primários no DNA geram mensageiros que envolvem a ativação de citocinas e stress (SCHUBERT M, *et. al.*, 2004). Essa sequência de eventos por sua vez é amplificada

produzindo proteínas tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6), os quais causam dano tecidual direto (SONIS S, 2004).

A fase I, de iniciação ocorre logo após a radiação ou quimioterapia. A lesão celular direta das células epiteliais basais ocorre simultaneamente com a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio (SONIS et al., 2004).

A fase II e III, a resposta primária ao dano e amplificação dos sinais, respectivamente, observadas nas células e tecidos da submucosa, são caracterizadas pela expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg I, e pela ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear- κ B (NF- κ B) (SCULLY *et al.*, 2006). Adicionalmente, ocorre a ativação de macrófagos e subsequente injúria tecidual, mediada pelas metaloproteinases e produção adicional de TNF- α . Logo, a liberação de mediadores inflamatórios, em resposta à quimio ou radioterapia, resulta em uma série de retroalimentações positivas, amplificando e prolongando a injúria tecidual, através de seus efeitos nos fatores de transcrição e nas vias da ceramida e caspases, resultando em apoptose e liberação de mais mediadores inflamatórios como as citocinas próinflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

A fase seguinte, fase IV é denominada ulcerativa e, é a mais sintomática e usualmente ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente. A lesão e morte das células basais epiteliais resultam em mudanças atróficas que culminam na real deterioração e quebra da mucosa. Nessa fase é comum a ocorrência de infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização de microorganismos. Os produtos da parede celular de bactérias penetram na submucosa estimulando a liberação de mais citocinas pro-inflamatórias, o que resulta em inflamação, dor, possíveis infecções secundárias ou influxo sistêmico de microorganismos e toxinas que, associado à neutropenia induzida pelas drogas antineoplásicas, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (ELTING et al. 1992, SONIS et al., 2004).

A fase V ou fase de cicatrização é biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, estimulando a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. Além disso, observam-se o retorno da flora microbiana normal e a recuperação do número de leucócitos (SONIS et al., 2004). Nosso grupo demonstrou que a glutamina e seu derivado estável alanil-glutamina aceleram a recuperação da mucosa oral lesada pelo uso de 5-FU (LEITÃO et al., 2007b).

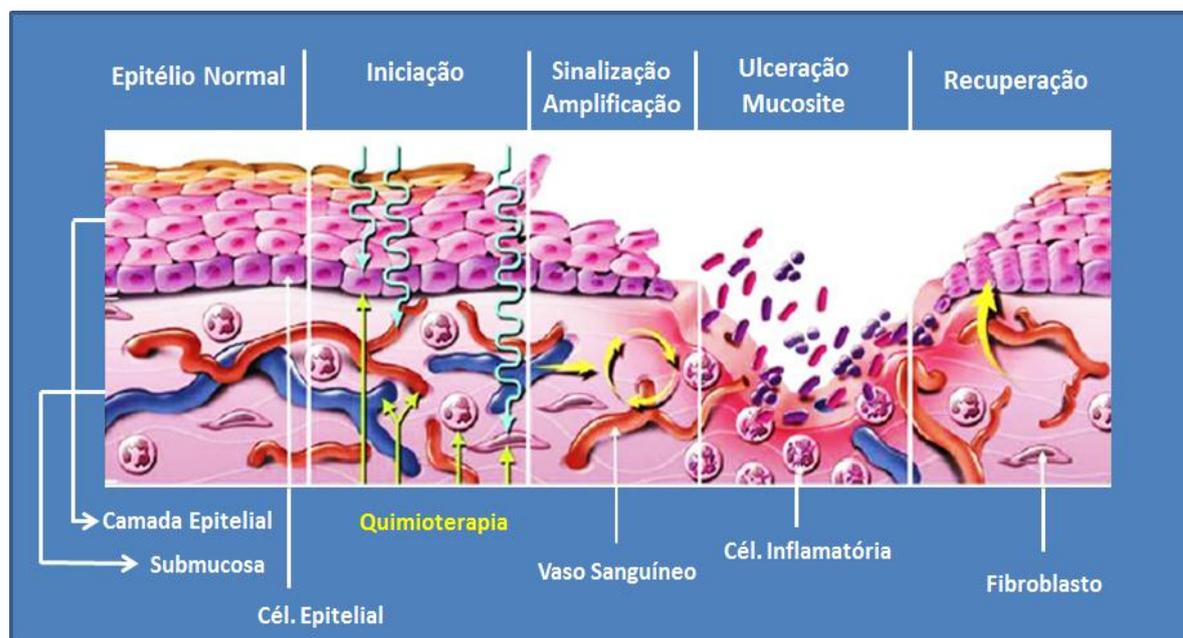


FIGURA 6: Fases Fisiopatológicas da Mucosite Gastrointestinal. Fonte: Adaptado de SANCHO, BATTLE, CLEVERS, 2004. *Nat Rev Cell Dev Biol*, 20:695-723, 2004.

Quando ocorre a amplificação de sinais e a liberação de citocinas pró-inflamatórias culminado numa fase inflamatória aguda, observa-se uma interação de diferentes estímulos externos e internos, e assim duas grandes vias de sinalização são ativadas, a via NF- κ B e a via MAP quinase.

1.8. As vias de sinalização celular

Os diferentes estímulos externos são integrados, internamente, por vias de sinalização celular, logo o uso de quimioterápicos como o 5-FU ativam vias de sinalização celular. Desse modo, no nível dos enterócitos, duas grandes vias de sinalização celular se distinguem: o fator de transcrição NF- κ B e a via das MAP quinases.

1.8.1. O fator de transcrição NF- κ B

O fator nuclear κ B é um fator de transcrição que desempenha um papel crítico na coordenação das respostas imune, inata e adaptativa, regulando a expressão gênica de vários mediadores celulares (ZINGARELLI *et al.*, 2003). Este fator foi descrito, pela primeira vez, em 1986, por Sen e Baltimore, como um fator nuclear capaz de se ligar à cadeia leve kappa

(k) de imunoglobulinas de linfócitos B, onde ele regula a transcrição (SEN & BALTIMORE, 1986).

Sabe-se, atualmente, que o NF- κ B é um fator ubíquo, expresso na maioria dos tipos celulares, e que é um dímero composto de membros da família Relish (Rel). Nos vertebrados a família NF- κ B/Rel engloba cinco sub-unidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB. Essas sub-unidades podem formar homodímeros ou heterodímeros em várias combinações. A mais comum consiste de dois polipeptídeos de 50 kDa (p50) e 65 kDa (p65). Normalmente, o NF- κ B se encontra no citoplasma, numa forma fisicamente inativa, devido à associação a proteínas inibidoras conhecidas como I κ Bs (Inhibitor κ B proteins) B (ZINGARELLI, 2005).

O NF- κ B pode ser ativado por diversos sinais, como: bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, produtos bacterianos (endotoxinas, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (como TNF- α e IL-1 β), radicais livres e agentes oxidantes (CAAMANO & HUNTER, 2002).

A ativação desse fator de transcrição requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos, isto é, as I κ Bs, em especial a I κ B- α , em resíduos específicos de serina (ZINGARELLI *et al.*, 2003). A degradação proteolítica das I κ Bs permite que o NF- κ B se transloque para o núcleo, onde ele regula a expressão de centenas de genes que são importantes nas respostas imune e inflamatória (ZINGARELLI *et al.*, 2003) (FIGURA 7). Esses incluem genes para citocinas, moléculas de adesão e quimioquinas, receptores requeridos para a adesão de neutrófilos e sua transmigração nas paredes dos vasos sanguíneos, receptores envolvidos no reconhecimento imune (como membros do complexo principal de histocompatibilidade) e proteínas envolvidas na apresentação de antígenos. Ativando a expressão de vários genes que interagem no processo de apoptose e regulam a sobrevivência e proliferação celular. O NF- κ B também modula a sobrevivência de neutrófilos e a proliferação e diferenciação de linfócitos B e T no local da inflamação, permitindo que essas células desempenhem suas funções imunológicas (SEN & BALTIMORE, 1986; CAAMANO & HUNTER, 2002; ZINGARELLI *et al.*, 2003).

Além do controle da resposta imune, o NF- κ B estimula a expressão de enzimas cujos produtos contribuem para a patogênese da resposta inflamatória, incluindo a ciclo-oxigenase-2, a forma induzível da óxido nítrico sintase, e uma variedade de citocinas pro-inflamatórias. Vários desses mediadores inflamatórios, que são regulados pelo NF- κ B (como TNF- α , IL-1 β e IL-8) podem, por sua vez, ativar este fator de transcrição, criando, dessa forma, um ciclo inflamatório que se auto mantém, o que aumenta a gravidade e a duração da resposta inflamatória (CAAMANO & HUNTER, 2002; ZINGARELLI *et al.*, 2003). Do mesmo modo,

como parte de um controle de “feedback” negativo do processo inflamatório, o NF- κ B induz a transcrição de seu próprio inibidor (I κ B- α), ativando um mecanismo que limita sua própria ativação. Desse modo, é possível que exista um balanço dinâmico entre o mecanismo de defesa e o papel inflamatório do NF- κ B. Entretanto, esse balanço pode ser desligado quando se ativa uma resposta inflamatória sistêmica exagerada, levando a uma ativação prolongada do NF- κ B e inapropriada expressão de moléculas tóxicas (CAAMANO & HUNTER, 2002; ZINGARELLI *et al.*, 2003).

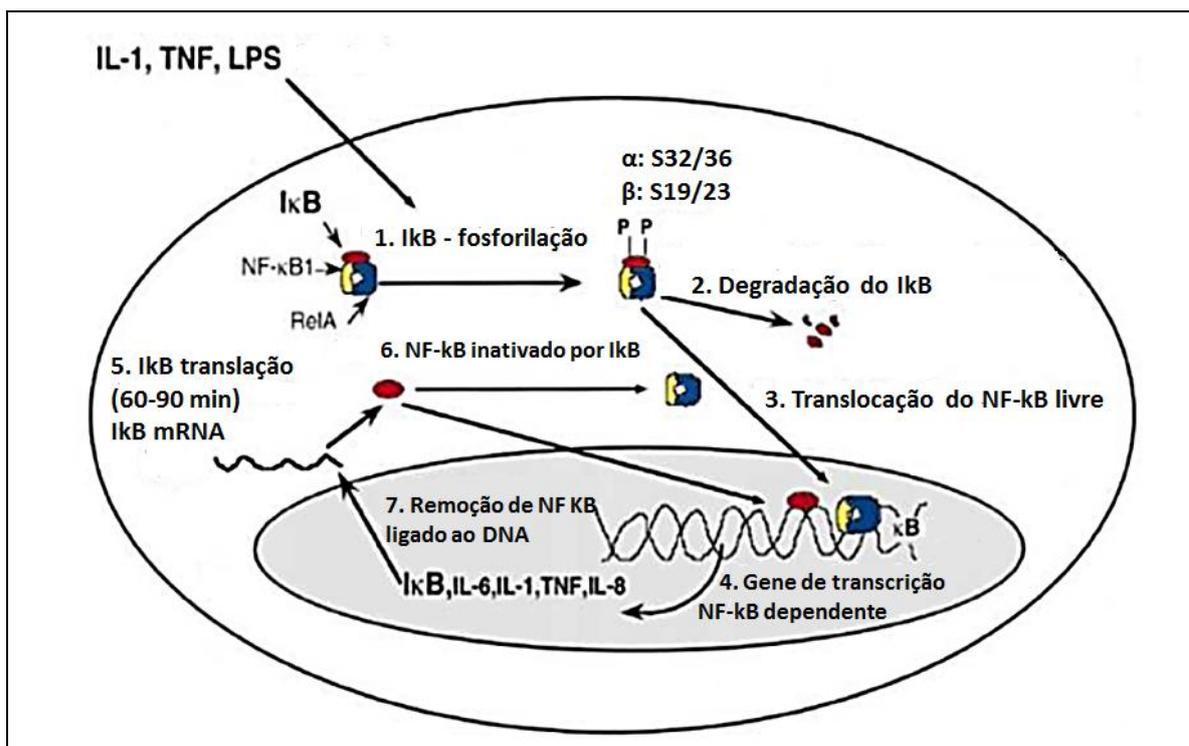


FIGURA 7. Ativação do fator de transcrição NF- κ B. O NF- κ B é mantido no citoplasma pelas proteínas inibidoras I κ Bs. Sob determinados estímulos, I κ B é fosforilado, ubiquitinado e degradado, e o NF- κ B fica livre para migrar para o núcleo, onde induz a transcrição de diversos genes dependentes de κ B. NF- κ B é, depois, inativado por novas proteínas I κ Bs sintetizadas. (JOBIN & SARTOR, 2000).

1.8.2 As MAP quinases

As MAP quinases são vias de sinalização fortemente conservadas ao longo da evolução. As vias envolvendo as MAP quinases constituem as vias mais importantes da transdução do sinal, da superfície celular ao núcleo. Elas estão implicadas na proliferação, diferenciação e morte celular. São uma cascata onde cada membro ativa outro por fosforilação dos resíduos treonina e/ou tirosina.

Na extremidade da cadeia encontramos as MAP quinases controle. A cascata clássica de MAP quinase consiste da ativação de três proteínas quinases intracelulares, que se inicia quando o primeiro membro, MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), é ativada. MAPKKK é uma proteína quinase que fosforila e ativa MAP quinase quinase (MAPKK), e essa ativação é seguida pela ativação de uma MAP quinase específica (FIGURA 8). Dessa maneira, as MAPKs ativam numerosas proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, levando a uma transdução do sinal.

A ativação da cascata de MAPK é rápida e possibilita às células responder a mudanças ambientais de uma maneira regulada. Três grandes grupos de MAP quinases são reconhecidas em células de mamíferos: ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase), p38 e JNK (c-Jun NH2 terminal kinase) (WAETZIG & SCHREIBER, 2003; CUSCHIERI & MAIER, 2005) que, junto com NF-kB, controlam a resposta celular ao estresse e à inflamação.

A MAP ERK foi a primeira proteína da família das MAPK identificada, apresentando-se sob duas isoformas, ERK1 e ERK2, também conhecidas por p44 e p42 MAPK e, normalmente, referida como ERK1/2 (p44/42). Esta proteína está envolvida, primariamente, na proliferação, transformação e diferenciação celular (COWLEY *et al.*, 1994; HILL & TREISMAN, 1995; HUNTER, 1995; MARSHALL, 1995). Sua ativação é iniciada pela fosforilação e ativação de Raf (MAPKKK), seguida da fosforilação e ativação de MKK1/2 (MAPKK), que leva à ativação de ERK1/2 (MAPK) (KOLCH, 2000) (FIGURA 9).

p38 MAPK, também conhecida como RH (ROUSE *et al.*, 1994) ou CSBP (HAN *et al.*, 1994), é ativada em resposta a estresses fisiológicos, endotoxina, estresse osmótico, exposição a raios ultravioleta, citocinas inflamatórias, LPS e fatores de crescimento (FRESHNEY *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1994; RAINGEAUD *et al.*, 1995) e participa na cascata de sinalização, controlando as respostas celulares a citocinas e estresses celulares (FRESHNEY *et al.*, 1994; HAN *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1994; ROUSE *et al.*, 1994). Cinco isoformas do grupo p38 já foram identificadas: p38-a (SAPK2), p38-b, p38-b2, p38-g (SAPK3) e p38-d (CHEN *et al.*, 2001). A expressão dessas

isoformas varia entre os tecidos. p38-a é altamente expressa em leucócitos e medula óssea, p38-b é expresso no coração e no cérebro, e p38-g é expresso, predominantemente, nos músculos esqueléticos. A ativação de p38 é iniciada pela fosforilação e ativação de MEKK4, TAK1, ASK-1, MLK3 (MAPKKK), seguida da fosforilação e ativação de MKK 3,4,6 (MAPKK), que fosforila p38 (MAPK) nos resíduos treonina 180 e tirosina 182 (CUSCHIERI & MAIER, 2005) (FIGURA 6).

A MAPK JNK foi originalmente identificada como uma proteína quinase de 54 kDa ativada por estresse e, por isso, é também conhecida por SAPK (stress-activated protein kinase). Ela é ativada por vários estímulos que ativam p38, como LPS, TNF- α , IL-1 β , estresse osmótico e radiação ultravioleta (DAVIS, 1999; ICHIJO, 1999; CHEN *et al.*, 2001; KYRIAKIS & AVARUCK, 2001). As proteínas quinases JNK são codificadas por três genes: JNK1, JNK2 e JNK3. JNK 1 e 2 são expressos de forma ubíqua, enquanto JNK3 é expresso apenas no cérebro, coração e testículos. Quando ativada como um dímero, JNK se transloca para o núcleo onde regula a transcrição, via seus efeitos no c-Jun, ATF-2 e outros fatores de transcrição. A ativação de JNK é iniciada pela fosforilação e ativação de MEKK1-5, TAK1, ASK1 e MLK1-4 (MAPKKK), seguida da fosforilação e ativação de MKK4 e MKK7 (MAPKK), que fosforila JNK (MAPK) na treonina 183 e tirosina 185 (CUSCHIERI & MAIER, 2005) (FIGURA 8).

A MAP JNK ativada fosforila ATF-2, Elk-1 e c-Jun. Desse modo, JNK desempenha um importante papel na ativação do fator de transcrição AP-1, que é constituído de um homodímero c-Jun ou um complexo c-Jun-c-Fos. Embora os efeitos de JNK não sejam tão bem compreendidos como os de ERK e p38, este desempenha um importante papel na expressão de TNF e óxido nítrico sintase induzível em macrófagos e monócitos (LAHTI *et al.*, 2003). Adicionalmente, JNK desempenha um papel na proliferação de células T, diferenciação e produção de IL-2. Os sinais de estresse são transmitidos a essa cascata pelas pequenas proteínas GTPases da família Rho (Rac, Rho, Cdc42). Rac1 e Cdc42 medeiam a estimulação de MEKKs e MLKs. Alternativamente, MKK4-7 podem ser ativadas por uma via independente de GTPases, via estimulação de um membro da família quinase centro germinal (GCK, germinal center kinase) (KYRIAKIS, 1999).

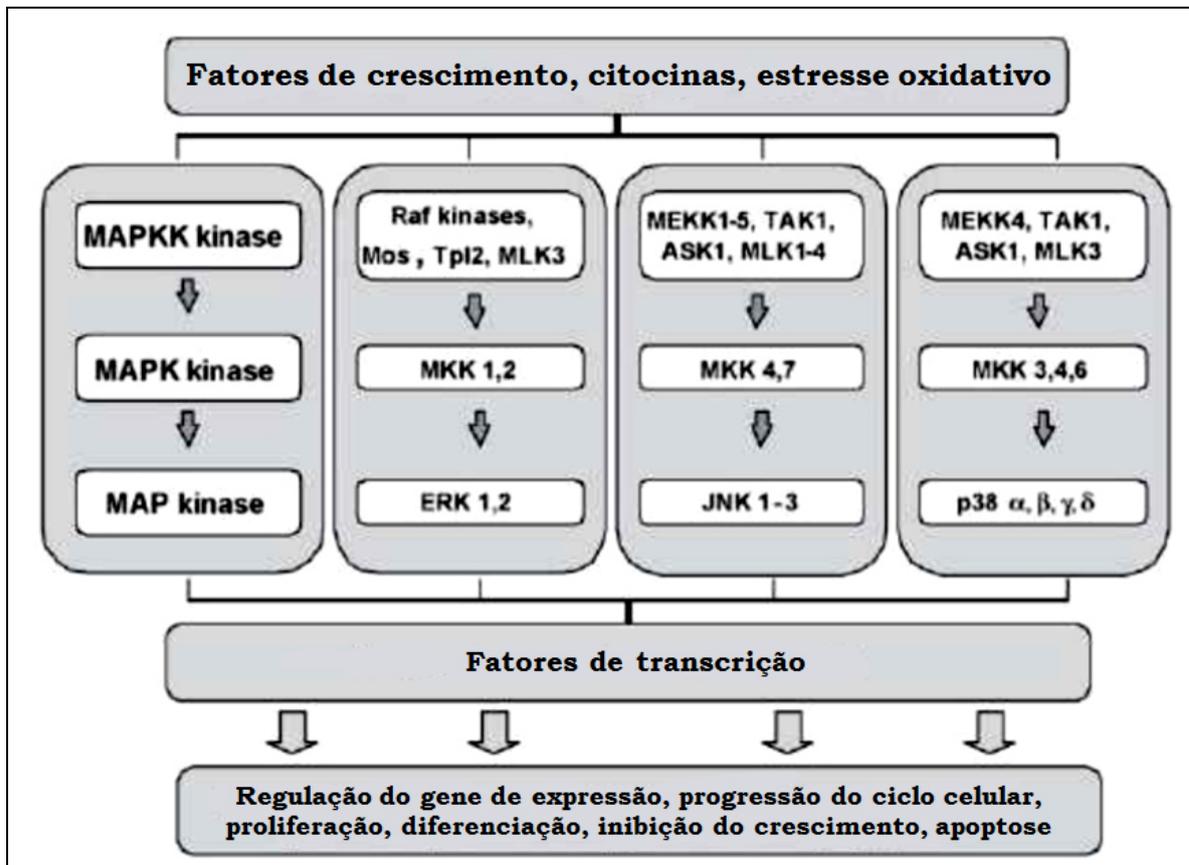


FIGURA 8. Esquema mostrando a sinalização celular via cascata das MAP quinases ERK, JNK e p38. (Adaptado de KATSOULIDIS *et al.*, 2005).

1.8.3. As Citocinas

Os quimioterápicos promovem a liberação de citocinas do epitélio e dos tecidos conectivos na primeira fase da inflamação (SONIS, 2015). Citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) podem iniciar uma resposta inflamatória que resulta em aumento da vascularização sub epitelial (PICO *et al.*, 1998). Uma quimiocina produzida e liberada por macrófagos e células epiteliais, é implicada na ativação de neutrófilos, monócitos, basófilos e linfócitos T por meio de sua ligação com o receptor CXCR2, a CXCL1 (TRAVES SL *et al.*, 2004).

Citocinas podem induzir apoptose e têm contribuído para a disfunção de barreira presente nos processos inflamatórios intestinais (STRATER *et al.*, 1997). Citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-2 e citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-1ra, TGF- β , IL-10 e IL-11 podem estar envolvidas na lesão e reparo da mucosa (WILSON; GIBSON, 1997).

O TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e monócitos ativados, exerce um papel chave como mediador das respostas inflamatórias e imunes (DOHERTY *et al.*, 1991; SCHMIDT-CHOUDHURY *et al.*, 1996). Muitos distúrbios estão frequentemente associados com uma elevação sérica dos níveis de TNF- α , e muitos procedimentos terapêuticos, como quimioterapia, irradiação e transplante de medula óssea, podem induzir a expressão de TNF- α (YANG *et al.*, 1997).

A lesão intestinal relacionada ao 5-Fluorouracil, leva à ativação de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 e IL-4 (JUSTINO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2013). O uso de animais *knockout* para o receptor do PAF (Fator de Ativação de Plaquetas) ou do antagonista de receptores de IL-1 (IL-1ra) preveniram o dano e os distúrbios de motilidade intestinais associados a este quimioterápico. Adicionalmente, Wu e colaboradores (2011), demonstraram que o uso do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) foi capaz de diminuir a apoptose nas criptas jejunais, de atenuar as alterações histopatológicas e de reduzir a gravidade da diarreia, em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil.

Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina que provoca uma variedade de respostas celulares e fisiológicas, incluindo a resposta imunitária, inflamação, hematopoiese, e oncogênese. Ela pode ser produzida diretamente pelas células musculares lisas durante a inflamação intestinal (SCHWARZ *et al.*, 2004; WEHNER *et al.*, 2005).

Sabe-se que uma infecção ou um dano no organismo, como o uso de um quimioterápico, resulta em inflamação, cuja principal característica é o recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido onde ocorreu o dano. Esse processo é direcionado por polipeptídeos quimiotáticos de 8 a 14 kDa, conhecidos como quimiocinas. Aproximadamente, 40 quimiocinas são conhecidas (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). A IL-8 foi identificada em 1987 como um novo tipo de citocina ativadora de neutrófilos e muitas de suas propriedades, incluindo sua estrutura tri-dimensional, receptores, mecanismos de sinalização e funções adicionais na angiogênese, progressão de tumores, mitose e remodelamento tissular, são bem conhecidas (BAGGIOLINI & CLARK-LEWIS, 1992). Uma de suas principais propriedades é a variação nos níveis de expressão. Normalmente, a IL-8 é fracamente secretada em células não-induzidas, mas sua produção é rapidamente induzida por uma grande variedade de estímulos, que abrangem as citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α ou IL-1 β (KASAHARA *et al.*, 1992; BRASIER *et al.*, 1998), bactérias (AIHARA *et al.*, 1997; HOBBIIE *et al.*, 1997), produtos virais (MURAYAMA *et al.*, 1997; MASTRONARDE *et al.*, 1998) e estresse celular (DEFORGE *et al.*, 1993; SHAPIRO & DINARELLO, 1995; LEE *et al.*, 1997; SONODA *et al.*, 1997). Entretanto, alguns estímulos, como IL-1 β e TNF- α ,

aumentam a expressão de IL-8 em mais de 100 vezes (KASAHARA *et al.*, 1992; MURAYAMA *et al.*, 1997; SONODA *et al.*, 1997; BRASIER *et al.*, 1998).

Enfim, as citocinas formam um grupo diversificado de proteínas de sinalização intercelular que regulam não apenas as respostas inflamatórias e imunológicas locais e sistêmicas, como também a cicatrização, a hematopoese e outros processos biológicos.

1.9. MYD88 e os Receptores Toll-Like

O MyD88 (fator de diferenciação mielóide 88) é uma molécula adaptadora essencial para sinalização através dos TLRs e IL-1R resultando na transdução de sinais e na produção de citocinas pró-inflamatórias.

Existem duas cascatas de sinalização, uma dependente de MyD88 e outra MyD88 independente. Na primeira via, o domínio TICAM (do inglês “*Toll Interleukin-1 receptor-containing adapter molecule*”) se associa à molécula adaptadora MyD88, comum a quase todos os TLR, que leva à ativação da expressão de centenas de genes da resposta inflamatória induzidos pelo fator de transcrição NF- κ B (KAWAI *et al.*, 1999; TAKEUCHI *et al.*, 2000).

Os receptores TLR3 e TLR4, entretanto, são capazes de ativar a via de sinalização independente do adaptador MyD88, que é mediada pelas moléculas adaptadoras TRIF e TRAM, com resultados distintos. Esta via é capaz de induzir a fosforilação de elementos reguladores de interferon (IRFs), culminando na síntese de interferons do tipo I, tais como IFN- γ e β . Outra característica desta via é a indução de NF- κ B tardiamente, em um processo mediado pela proteína cinase RIP-1 (YAMAMOTO *et al.*, 2000; UEMATSU & AKIRA, 2007).

Os receptores Toll-like (TLRs) funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e monócitos/macrófagos. Em geral, reconhecem padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são moléculas endógenas liberadas nos processos de morte celular ou necrose, e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como flagelina, DNA bacteriano, peptidoglicano, RNA viral ou LPS (Figura 9) (KAWAI & AKIRA, 2009; 2010; TAKEUCHI & AKIRA, 2010). Este processo de reconhecimento dará início à resposta imune inata caracterizada pela secreção de citocinas e quimiocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão. A ação conjunta desses fatores irá estimular e facilitar a migração de células especializadas responsáveis por desencadear a resposta imune adaptativa (AKIRA & TAKEDA, 2004; LIEW *et al.*, 2005; ARANCIBIA *et al.*, 2007).

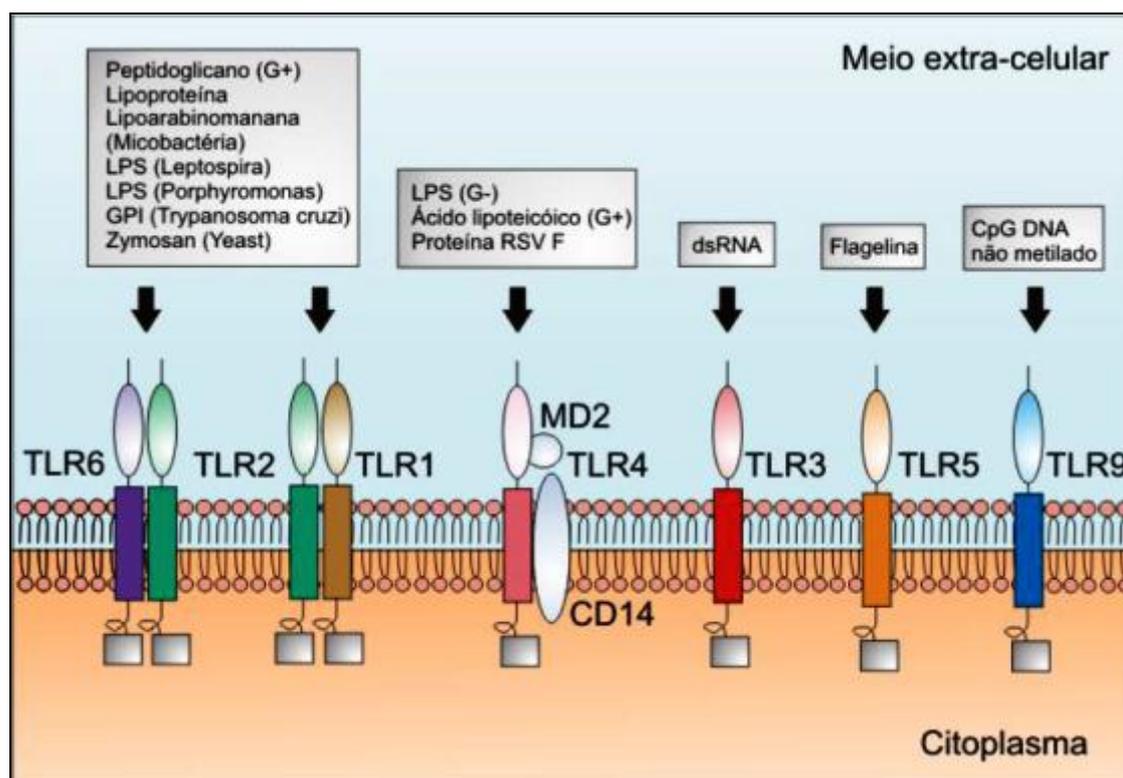


FIGURA 9: Ligantes específicos para receptores Toll-like. Os receptores Toll-like (TLR) reconhecem uma variedade de Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O reconhecimento do TLR4 requer duas proteínas acessórias: CD14 e MD2. O TLR2 reconhece um ampla quantidade de ligantes não relacionados estruturalmente e funciona em combinação com outros (mas não todos) receptores Toll, incluindo TLR1 e TLR6. TLR3 está envolvido no reconhecimento de fita-dupla (dsRNA). TLR5 é específico para flagelina bacteriana, enquanto TLR9 é o receptor para CyG não metilado, que são abundantes no DNA bacteriano. LPS: Lipopolissacarídeo. G-: Gram negativo. G+: Gram positivo. Proteína F do vírus sincicial respiratório. CYG DNA: DNA bacteriano. Fonte: Adaptado de MEDZHITOV, 2003. Nature Reviews Immunology, 1:135-145, 2003.

Os TLRs são encontrados na membrana citoplasmática ou em compartimentos endossomais intracelulares, estruturalmente os TLRs são classificados como receptores transmembrana e possuem três características comuns; um domínio extra-celular contendo repetições ricas em leucina (LRR), uma região transmembranar curta, e um domínio intracelular homólogo ao do receptor para IL-1 conhecido como TIR (Receptor Toll/IL-1) essencial para a transdução dos sinais (AKIRA & TAKEDA, 2004). A família dos receptores do tipo Toll compreende, até o momento, treze proteínas identificadas em mamíferos (13 receptores identificados em camundongos e 11 receptores em humanos) (KAWAI & AKIRA, 2009).

Os receptores Toll-like e a família dos receptores da interleucina 1 (IL-1Rs), incluindo IL-1R e IL-18R, apresentam homologia em sua região citoplasmática, conhecida como domínio Toll/IL-1R (TIR) (**Figura 9**) (SLACK *et al*, 2000; AKIRA & TAKEDA, 2004). Apesar desta similaridade, a porção extracelular de ambos receptores é estruturalmente diferente. Os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, de modo que eles contêm um domínio intracelular, constituído de proteínas do tipo TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM), e um extracelular (repetições ricas em leucina, LRR). Entretanto, os TLRs 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente (AHMAD-NEJAD *et al*, 2002).

O domínio TIR é requerido para iniciar a geração dos sinais intracelulares, sendo que a proteína MyD88 está presente em todos os receptores, exceto no TLR3 (AKIRA & TAKEDA, 2004; McGETTRICK & O'NEILL, 2010). Este domínio inicia o recrutamento do gene adaptador primário da resposta mieloide (MyD88) e a consequente ativação da família de receptores de IL-1 associado a quinases (IRAK). A ativação da IRAK induz a liberação de serina e treonina quinases responsáveis pela degradação do I κ B α (inibidor de NF- κ B). A diminuição das concentrações citoplasmáticas I κ B α permite que o fator de transcrição NF- κ B, se desloque do citoplasma para o núcleo, uma vez no núcleo da célula, o NF- κ B interage com genes κ B dependentes, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios importantes para a resposta imune (Figura 10) (TAKEDA *et al*, 2003; AKIRA & TAKEDA, 2004).

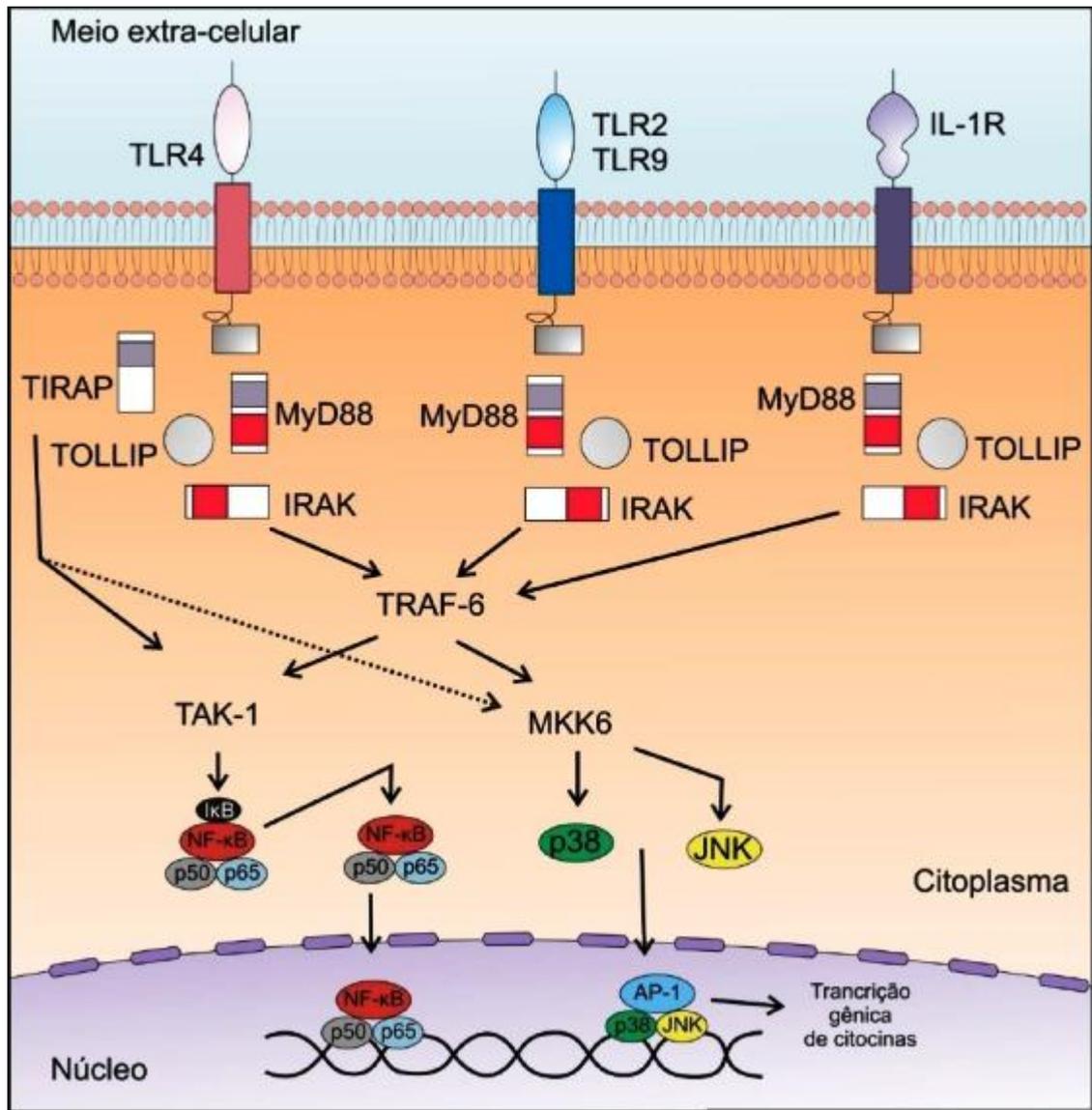


Figura 10: Vias de Sinalização dos receptores Toll-like. Os receptores Toll-like (TLR) e a família de receptores IL-1 apresentam diversos componentes da sinalização, incluindo o adaptador MyD88, a proteína de interação do Toll (TOLLIP), a proteína quinase IRAK e TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF). TRAF6 pode ativar o fator nuclear κB (NF-κB) através de TAK1 e JNK e p38 MAP quinase através de MKK6 (proteína quinase 6 ativada por mitógeno). TLR4 sinaliza através de outra proteína adaptadora além do MyD88. TIRAP (Domínio de homologia dos receptores Toll/Interleucina-1 que contém a proteína adaptadora) que ativa a sinalização do TLR4 independente de MyD88. TLR: Receptor Toll-like, MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88, IRAK: Kinase associada ao receptor de IL-1, TRAF6: Fator 6 associado ao receptor TNF, JNK: Proteína Kinase c-Jun NH₂-terminal. Fonte: Adaptado de MEDZHITOV, 2003. Nature Reviews Immunology, 1:135-145, 2003.

Sugere-se que os mecanismos regulados por TLRs possam ter participação fisiopatológica em uma gama de desordens, incluindo doenças autoimunes, alérgicas ou infecciosas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Estudos mostram que os receptores Toll-like estão envolvidos em vários distúrbios gastrintestinais, tais como doença celíaca (THOMAS *et al*, 2006), doença inflamatória intestinal (FRANCHIMONT *et al*, 2004), câncer de cólon (CLEVERS, 2004) e colite infecciosa (UEMATSU *et al*, 2006).

O receptor Toll-like 2 (TLR2) reconhece componentes de uma grande variedade de microorganismos. Estes incluem lipoproteínas de patógenos, tais como bactérias gram-negativas, *Mycoplasma* e *Shigella*, peptidoglicano, ácido lipoteicóico de bactérias gram positivas e reconhece LPS atípicos, entre outros (**Quadro 1**) (NETEA *et al*, 2003).

O receptor Toll-like 4 (TLR4) forma um complexo membranar com as proteínas CD14 e MD-2, é ativado pelo PAMP, lipopolissacarídeo (PARK *et al.*, 2009), iniciando uma sinalização de um domínio intracelular TIR (Toll/Receptor IL-1) via moléculas adaptadoras, predominantemente MyD88 (Fator de diferenciação mieloide 88) (O'NEIL & BOWIE, 2007). Cinco das seis cadeias lipídicas do LPS se ligam a MD2 e a cadeia lipídica remanescente associa-se ao TLR4 ocorre então a homodimerização e a fase inicial da ativação do receptor (KAWAI *et al*, 2010).

QUADRO 1 – Receptores Toll-like e seus principais ligantes

| Receptor | Ligante | Origem do ligante |
|--------------|---|---|
| TLR1 | Triacil Lipopeptídeos Fator solúvel | Bactérias e micobactérias <i>Neisseria meningitidis</i> |
| TLR2 | Lipoproteínas/Lipopeptídeos Peptidoglicano Ácido lipoteicóico Lipoarabinoman Modulin fenol solúvel Fosfolípidios glico Inositol Glicolípido Lipopolissacarídeo atípica Lipopolissacarídeo atípica Zimosan Proteína de choque térmico 70 | Vários patógenos Bactéria gram positiva Bactéria gram positiva Micobactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungos Hospedeiro |
| TLR3 | RNA de dupla hélice | Vírus |
| TLR4 | Lipopolissacarídeo Taxol Proteína de Fusão Proteína de choque térmico 60 Proteína de choque térmico 70 Oligossacarídeos de ácido hialurônico Fibrinogênio | Bactéria gram negativa Plantas Vírus sincicial respiratório <i>Chlamydia pneumoniae</i> Hospedeiro Hospedeiro Hospedeiro |
| TLR5 | Flagelina | Bactéria |
| TLR6 | Diacil lipopeptídeos Ácido lipoteicóico Zimosan | <i>Mycoplasma</i> Bactéria gram positiva Fungos |
| TLR7 | Imidazoquinolina Loxoribina RNA de dupla hélice | Compostos sintéticos Compostos sintéticos Vírus |
| TLR8 | Imidazoquinolina RNA de dupla hélice | Compostos sintéticos Vírus |
| TLR9 | DNA contendo CpG | Bactérias e vírus |
| TLR10 | N.D | N.D |
| TLR11 | N.D | Bactérias uropatogênicas |

Fonte: AKIRA & TAKEDA, 2004. Nat. Rev. Immunol. 4: 499-511, 2004. TLR: Receptores Toll-like. N.D.: Não determinado

Por ser uma bactéria Gram-negativa, a *E. coli* exprime em sua parede externa o LPS, uma molécula extremamente imunogênica. A LBP (LPS-binding protein), proteína de ligação ao LPS, é uma proteína sérica cuja principal característica é apresentar o LPS sob a forma monomérica ao receptor CD14, sua forma livre em solução sendo micelar (SALEZ & MALO, 2004). A fixação do LPS à célula não provoca a ativação celular de imediato. O intervalo de

tempo necessário à ativação (15 a 30 minutos) se explica pela necessidade de internalizar o complexo LPS/CD14. Alguns estudos mostram que o bloqueio da fusão endossômica ou da internalização provocam uma ruptura na sinalização induzida pelo LPS (TRANTAFILOU & TRIANTAFILOU, 2002).

Baseado na literatura, o presente trabalho destinou-se a pesquisa dos possíveis mecanismos das vias celulares NF-kB, MAPK e TLR/MyD88 que são alterados pelo 5-Fluorouracil e que podem estar envolvidos no mecanismo de ação do SB.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das doenças mais incidentes no mundo, sendo a segunda causa de óbito. Estima-se que em 2030 existam 75 milhões de sobreviventes a esta doença, muitos sofrendo os efeitos colaterais da terapia anti-câncer. Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais prevalente em todo o mundo e responsável por cerca de 8% das mortes relacionadas ao câncer. E, o 5-Fluoruracil, é um antineoplásico bastante utilizado nos tratamentos anticâncer, principalmente para o câncer colorretal, e, infelizmente esse tratamento antineoplásico pode causar diversos efeitos colaterais, como efeito colateral bastante relevante temos a mucosite intestinal.

Existe um grande número de agentes que têm sido estudados para a prevenção e ou manejo das mucosites induzidas pela quimioterapia do câncer (HERRSTEDT, 2000). Assim as abordagens terapêuticas ou preventivas das formas intestinais das mucosites têm incluído os usos de citocinas, prostaglandinas, vitaminas, drogas antiinflamatórias, glutaminas e probióticos (SUMAN A, *et al.* 2004).

O interesse no uso de agentes microbianos vivos, os probióticos, com o propósito de beneficiar a saúde do hospedeiro e prevenir ou tratar doenças tem sido bastante explorado nesses últimos anos.

Esses organismos vêm sendo propostos como medicamentos para prevenção ou tratamento de um grande número de distúrbios gastrointestinais. A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes. Os efeitos benéficos destes microrganismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano. O que se faz, neste caso, é a utilização, em grande quantidade, daqueles que possuem eficácia comprovada, podendo ser constituintes normais da microbiota, como é o caso das bifidobactérias e dos lactobacilos, ou não, como da levedura *Saccharomyces boulardii*.

Atualmente, a principal levedura disponível no mercado para uso como probiótico em seres humanos, e com eficácia comprovada, é a *SB* (Floratil®). É um medicamento patentado pelos Laboratoires Biocodex (Paris, França), e comercializado no Brasil pela MERCK S.A. (Rio de Janeiro, RJ).

No presente trabalho objetivamos investigar o efeito da levedura *Saccharomyces boulardii* nos padrões gerais e inflamatórios do desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo 5-Fluorouracil, tanto em animais como *in vitro*, utilizando as células de adenocarcinoma de cólon retal humano (Caco2). Os experimentos celulares foram realizados no laboratório da Dra. Dorota Czerucka (Laboratoire de Gastroentérologie et Nutrition,

Faculté de Médecine, Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France). Que já trabalha com o *Saccharomyces boulardii* desde 1982, mostrando sua eficácia no combate, principalmente às infecções bacterianas gastrintestinais.

Acredita-se que, por meio dessas avaliações do *Saccharomyces boulardii* na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil, podemos encontrar ações terapêuticas mais adequadas que possam ser implementadas melhorando a saúde e a qualidade de vida das pessoas que precisam utilizar a terapia anticâncer.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* em eventos inflamatórios e nas vias de sinalização celular NF-kB, MAPK e TLR/MyD88 na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil e em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* nas alterações de variação de peso corporal, diarreia, alterações histopatológicas, infiltração neutrofílica no curso da mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.
- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* na atividade anti-inflamatória e produção de citocinas pró-inflamatórias no curso da mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos e, em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil, *in vitro*.
- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* na via de sinalização celular, NF-kB, em animais com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil e, em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil, *in vitro*.
- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* na via de sinalização celular, MAPK (ERK 1/2, p38 e JNK), em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil, *in vitro*.
- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* na participação da proteína adaptadora MyD88 na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.

- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão dos receptores Toll-Like 2 e Toll-like 4 na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.

- ✓ Avaliar o efeito do *Saccharomyces boulardii* na participação de receptores Toll-like 2 e Toll-like 4 em células Caco2 incubadas com 5- Fluorouracil e infectadas ou não com Lipopolissacarídeo (LPS).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss jovens, machos, pesando entre 25-30g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, à temperatura ambiente, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12h, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”. Os animais foram colocados em jejum de sólidos 18 horas antes da realização dos experimentos.

4.2. ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos experimentais desenvolvidos foram realizados de acordo com os Padrões de Uso de Animais de Laboratório da UFC. A pesquisa foi previamente submetida à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e aprovado de acordo com o protocolo CEPA nº 98/11. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

4.3. CULTURA CELULAR

Foram utilizadas células epiteliais de adenocarcinoma do cólon humano (Caco2), que foram obtidas da European Collection of Animal Cell Culture (Salisbury, England) e cultivada em frascos de 75 cm², a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, cultivadas em frascos de 75 cm², em meio completo, constituído dos meios Dulbecco-Vogt modified Eagle (DMEM) (SIGMA, Saint Quentin 73 Fallavier, France), na proporção de 1:1, suplementado com 1% de glutamina, 1% MEM Non-essential Amino Acid Solution (SIGMA M7145), 20% de soro fetal bovino (HYCLONE, Bezons, France), 50 mg/ml de penicilina e 50 mg/ml de estreptomicina (SIGMA, Saint Quentin Fallavier, France), conforme descrito por CZERUCKA et al. (2000). O meio foi trocado a cada 48 horas e, após confluência de

aproximadamente 80-90%, as células foram tripsinizadas com uma solução de 0,25% de tripsina-Edta (SIGMA) e, cultivadas em placas de 6 poços para os experimentos posteriores.

a) Tripsinização e contagem das células

Antes da realização da contagem, as células aderidas (Caco2) na placa de cultura confluyente foram liberadas da superfície em que se encontravam aderidas. Utilizou-se Tripsina-EDTA, a tripsina age digerindo e clivando as proteínas de adesão; e o EDTA, por sua vez, quebra os cátions divalentes livres (CURI & PERES, 2005).

Para iniciar o processo de tripsinização, verificou-se a confluência das células com o auxílio do Microscópio invertido, em seguida o frasco foi devolvido à incubadora até o momento do uso. É feito então o processo de limpeza do fluxo laminar ligando-se a luz ultravioleta durante 30 minutos, colocaram-se no fluxo todo o material a ser utilizado.

Adicionou-se 1 mL de Tripsina-EDTA ao frasco com as células a fim de desprendê-las durante 5 minutos na estufa. As células já tripsinizadas adicionaram-se 4 a 5 mL de meio com soro bovino fetal misturando suavemente a solução. As proteínas do soro são clivadas pela tripsina e competem com as moléculas de adesão das células, permanecendo as viáveis. Após o recolhimento da solução (células, meio, tripsina-EDTA) para um tubo falcon de 15 mL foram centrifugadas a 1500 rpm por 8 min sob refrigeração a 4°C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante do tubo falcon, e em seguida adicionaram-se ao pellet 5 mL de meio com glutamina e ele foi resuspendido. Depois, retirou-se 100 µL da suspensão de células e colocados em tubo de 2 mL contendo 900 µL de meio DMEM, fazendo uma diluição de 1:10 para a realização da contagem de células.

A contagem de células foi realizada na câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico (100X), foram contados os quatro quadrantes e feita a média para obtenção do resultado. As células sobre as linhas inferiores e da direita ou superiores e da esquerda foram excluídas da contagem. A concentração total de células na suspensão original foi calculada da seguinte forma:

$$A = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição (10)}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados contados}}$$

Sendo a seguinte fórmula utilizada para o plaqueamento das células:

$$A \times 10^5 \times V1 = C2 \times V2$$

A – concentração contada na câmara de Neubauer

V1 – volume a ser retirado das células

C – concentração de células desejada para o experimento

V2 – volume total para preenchimento das placas.

Após o preparo da nova solução, os poços foram plaqueados para os experimentos. Foi verificada ao microscópio invertido a quantidade de células adicionadas aos poços e em seguida levados a incubadora de CO₂.

4.4. LEVEDURAS

O probiótico utilizado foi o *Saccharomyces boulardii* do Laboratoires Biocodex, Paris, França (Ultra-levure®) e do Laboratório MERCK, Rio de Janeiro, RJ, Brasil (Floratil®).

As linhagens foram mantidas em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 25% de glicerol e conservadas a -86°C, em tubos criogênicos de 2 ml. Para todos os experimentos celulares, as leveduras foram crescidas em meio YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), a 37°C, por 24 h, sob agitação constante (150 rpm) e concentradas para obter uma quantidade de 10⁹ UFC/ml.

4.5. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORAIS

- Agitador Vortex – Cetomart MV
- Autoclave
- Balança Analítica Marte AI200
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Banho-Maria BM100, Fanem
- Bomba Perfusora 900, Holter Holler. Extracorporeal Medical Specialties, King of Prussia, PA, EUA
- Câmera de contagem Neubauer
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- Contador Automático de Células - Colter
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas - ELISA ELX800, Biotek
- Espectrofotômetro UV-VIS
- Estufa Incubadora de CO₂
- Fluxo Laminar
- Fotômetro de chama 443, Instrumentation laboratory, Lexington, EUA
- Frasco para cultivo celular de 75 cm² (FALCON)
- Freezer -80°C, Thermo Scientific
- FujiFilm imaging system (LAS3000)
- Gaiola metabólica em inox
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8
- HPLC c/coluna de troca iônica com software analisador de Carboidrato BioLC, Dione
- Lâmina lisa para microscopia 26 x 76 mm
- Lamínula 24 x 32 mm
- Lamínula circular 13 mm
- Material cirúrgico
- Medidor de pH, Hanna Instruments HI 8519N
- Membrana para Western Blotting - "Hyband" (GE Healthcare)
- MicroAmp, 96well 0,1ml (Applied Biosystems)
- Micropipeta Multicanal Gilson 200 µL

- Micropipetas de 20, 100, 200 e 1000µl - Gilson
- Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000 µL
- Microscópio binocular Alphaphot2 VS2 - Nikon
- Microscópio Confocal, Olympus
- Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Microscópio óptico de invertido Nikon Diaphot
- Micrótomo - Olympus
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- Odyssey FC (Li-Cor Biosciences)
- Pipetas sorológicas de 1, 5 e 10 mL
- Placa de 96 poços – TPP
- Placa estéril de 6 e 24 poços
- Plástico filme (Saran)
- Ponteiras para pipetas automáticas - Gilson
- PTC-100 Programmable Thermal Controller - MJ Research, Inc.
- Seringas - B-D Plastipak
- Step One Plus – qPCR - Applied Biosystems
- Tubos de Falcon 15 e 50 mL

4.6. DROGAS E SOLUÇÕES

- 2-Mercaptoethanol, for electrophoresis (Sigma)
- 5-Fluorouracil (5-FU) – Eurofarma
- Ácido Sulfúrico PA – Reagen
- Ácido Tricloroacético 20% (TCA) – Vetec
- Ácido tricloroacético 50% - Vetec
- Acrilamida 30% (Bio Rad)
- AEBSF (Sigma)
- Água destilada
- Água Mili-Q
- Albumin Bovine - BSA 10% (Sigma)
- Álcool 70%

- Amido Black (Sigma)
- Ampicilina (Sigma)
- APROTININE (Sigma)
- Avidina-Peroxidase (Dako)
- Azul de tripan 0,04%, (Sigma)
- Bleu Laemli
- Brometo de hexadecitrimetilamônico 0,5% (HTAB) – Vetec
- Caldo BHI (Brain Heart Infusion)
- Cloreto de Potássio (KCL) 1,15% - Vetec
- Cloridrato de Quetamina 10% (Frasco ampola 10mL, Kensol®)
- Cloridrato de Xilazina 2% (Frasco ampola 10mL, Kensol®)
- Diaminobenzidina –DAB (Dako)
- Dianisidine
- Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 100% (Merck)
- DMEN + GlutaMAX (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco by life Technologies)
- DMSO - Dimethyl sulfoxide (Sigma)
- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Gibco by life Technologies)
- DTNB 0,01M – Fluka
- ECL - Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)
- EDTA 0,02M – Dinâmica
- Eosina (Merck)
- Éter etílico – Dinâmica
- Fenolsultaleina (PSP)
- Gentamicina
- GoTaq qPCR Master Mix (Promega)
- Hematoxilina (Merck)
- Kit Bioquímico para Enterobacterias (Probac®)
- Kit de extração de RNA (Applied Biosystems)
- Kit Fermentas (síntese de DNAc)
- Kit Macherey-Nagel (preparação de RNA)
- LEUPEPTINE (Sigma)
- Meio Agar BHI
- Meio Agar Muller Hinton
- Meio de cultura DMEM (Sigma)
- Men Non- Essential Amino Acid Solution

- MTT 5mg/mL (Sigma)
- NaCl
- NADPH
- Nitrato Redutase
- Nucleic Acid and Protein Purification (Macherey-Nagel)
- o-dianisidina (Sigma)
- Paraformaldeído 4% (PFA)
- Pepstatine (Sigma)
- Peróxido de Hidrogênio - Merck-Brasil
- Peróxido de Hidrogênio 30% (Sigma)
- Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)
- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)
- Saccharomyces boulardii (Floratil ®) - Merck-Brasil
- Saccharomyces boulardii (Biocodex®) - France
- Salina (NaCl 0,9%) - Fresenius, Brasil
- Salina tamponada com fosfato (PBS)
- SDS 10%
- Solução de Açúcares contendo 250 mg/L de Lactulose e 50 mg/L de manitol (IBIMED)
- Solução de Descoloração (Bio Rad)
- Solução de Griess – Synth
- Solução de Lavagem – TBS (Bio Rad)
- Solução de NaOH 0,1N e 0,5N - Synth
- Solução de Stripping (Bio Rad)
- Solução glicosada 5% - Synth
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%).
- Soro Bovino fetal (Sigma)
- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)
- Tampão de Corrida (Bio Rad)
- Tampão de Lise (Bio Rad)
- Tampão de Transferência (Bio Rad)
- Tampão fosfato de potássio - Synth
- Tampão PBS com anti-proteases – Synth
- Tampão TRIS 0,4M pH 8.9 – Vetec
- Temed
- Tribromoetanol 25% - Sigma Aldrich

- Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma)
- Tris-HCL
- Tween20 (Sigma)
- Vermelho de fenol 0,75mg/ml – Vetec

4.7. ANTICORPOS E PRIMERS

4.7.1. ANTICORPOS

| | |
|---------------------|--------------------------|
| anti-goat | DAKO |
| anti-mouse | DAKO |
| anti-Rabbit | DAKO |
| anti-TLR2 | abcam |
| anti-TLR4 | abcam |
| ERK1/2 total | invitrogen |
| ERK1/2 total | Cell Signaling |
| JNK total | invitrogen |
| JNK total | Cell Signaling |
| MYD88 | abcam |
| NFkb | Santa Cruz Biotechnology |
| NOS2 | Santa Cruz Biotechnology |
| P38 total | invitrogen |
| P38 total | Cell Signaling |
| pERK1/2 | invitrogen |
| pERK1/2 | Cell Signaling |
| pJNK | invitrogen |
| pJNK | Cell Signaling |
| pP38 | invitrogen |
| pP38 | Cell Signaling |

4.7.2. PRIMERS

| | | |
|-----------------------------------|---------------|---------------------------------|
| 18s _F | Eurogentec | CGGCTACCACATCCAAGGAA |
| 18s _R | Eurogentec | GCTGGAATTACCGCGGCT |
| IkB up | Sigma Proligo | GGAGCGCTTGGTGGACGAT |
| IkB down | Sigma Proligo | CTCATCCTCGCTCTCGGGTAG |
| TNF-α _F | Eurogentec | TCAATCGGCCCGACTATCTC |
| TNF-α _R | Eurogentec | CAGGGCAATGATCCCAAAGT |
| IL1-β _F | Eurogentec | CCCTAAACAGATGAAGTGCTCCTT |
| IL1-β _R | Eurogentec | GTAGCTGGATGCCGCCAT |
| IL-8 _F | Eurogentec | TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG |
| IL-8 _R | Eurogentec | AGTGTGGTCCACTCTCAATC |
| IL-6 _R | Eurogentec | GGCGCTTGTGGAGAAGGA |
| IL-6 _F | Eurogentec | CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA |
| IL-4 _F | Sigma Proligo | ACAGAGCTATTGATGGGTCT |
| IL-4 _R | Sigma Proligo | GTGATGTGGACTTGGACTCA |
| IL-12 _F | Sigma Proligo | GGGACATCATCAAACCAGACC |
| IL-12 _R | Sigma Proligo | GCCAACCAAGCAGAAGACAGC |
| IFN gamma _F | Sigma Proligo | TCTGAGACAATGAACGCTAC |
| IFN gamma _R | Sigma Proligo | GAATCAGCAGCGACTCCTTT |
| iNOS up | Sigma Proligo | TGCTGTATTTCCCTTACGAGGCCGAAGAAGG |
| iNOS down | Sigma Proligo | GCTGCTTGTTAGGAGGTCAAGTAAAGGGC |
| TLR2 _F | Eurogentec | TCCTGTGCCACCGTTTCC |
| TLR2 _R | Eurogentec | GCTTTCCTGGGCTTCCTTTT |
| TLR4 _F | Eurogentec | CAAATCTCTCAAAGGCTTACTTTCA |
| TLR4 _R | Eurogentec | CAAGGCTTGGTAGATCAACTTCTG |

4.8. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.8.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais camundongos machos SWISS foram divididos em grupos (n= 6-8).

| | |
|-----------------------|---|
| Grupo Controle | Controle negativo injetado com salina (NaCl 0,9%, i.p.) sacrificados no dia 4 experimental; |
| Grupo 5-FU | Animais injetados com 5-Fluorouracil (450mg/kg, i.p., dose única) sacrificados no dia 4 experimental; |
| Grupo SB | Animais tratados com <i>Saccharomyces boulardii</i> (1.10^9 UFC/kg, gavagem, durante 3 dias) sacrificados no dia 4 experimental; |
| Grupo 5-FU+SB | Animais injetados com 5-Fluorouracil (450mg/kg, i.p.) e tratados com <i>Saccharomyces boulardii</i> (1.10^9 UFC/kg, gavagem) sacrificados no dia 4 experimental; |

4.8.2 INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL POR 5-FLUOROURACIL E TRATAMENTO COM *Saccharomyces boulardii*

a) Animal

Como o esquema mostrado na figura 11, os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n= 6-8, por grupo), um grupo salina (controle negativo) injetado com salina (NaCl 0,9%, i.p.), um grupo 5-FU com camundongos tratados com 5-FU (450 mg/kg, i.p. dose única), um grupo SB com camundongos tratados com *Saccharomyces boulardii* (1.10^9 UFC/kg, gavagem, durante 3 dias) e um grupo 5-FU+SB com camundongos injetados com 5-Fluorouracil (450mg/kg, i.p. dose única) e tratados com *Saccharomyces boulardii* (1.10^9 UFC/kg, gavagem, durante 3 dias). No 4º dia experimental todos os animais foram levemente anestesiados com tribromoetanol, amostras de sangue periférico foram coletadas diretamente do plexo retro-orbital para a contagem total de leucócitos plasmáticos.

Posteriormente, foi realizada a eutanásia e os fragmentos dos segmentos de jejuno e íleo foram retirados e congelados no freezer à -80°C para posterior dosagem da atividade da

enzima mieloperoxidase (MPO), citocinas, análises histopatológicas e imunohistoquímicas. (SOARES *et al.*, 2008).

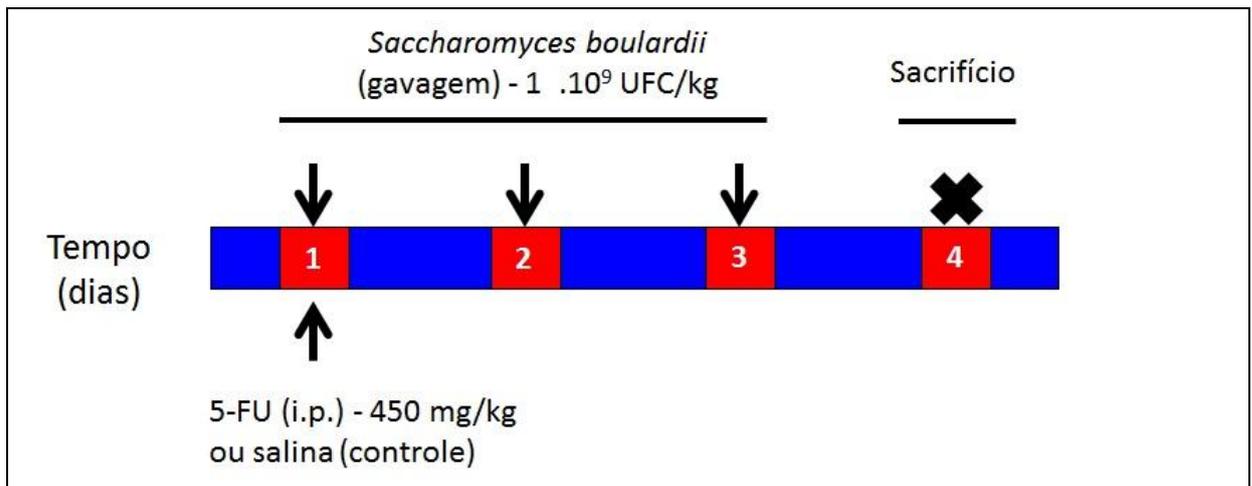


FIGURA 11 – Esquema da indução da mucosite por 5-fluorouracil e tratamento com *Saccharomyces boulardii* em camundongos

b) Célula

Como o esquema mostrado na figura 11 após as células serem cultivadas em placas de 6 poços com cerca de 1×10^9 cel/ml, elas foram tratadas com 5-FU na concentração de 1mM, co-incubadas ou não com *Saccharomyces boulardii* na concentração de $1 \cdot 10^9$ UFC/ml (BIOCODEx), pelo período de 24h e, o grupo controle não recebeu nada. Após foram tripsinizadas e utilizadas para Western blotting e dosagens de proteínas por qPCR.

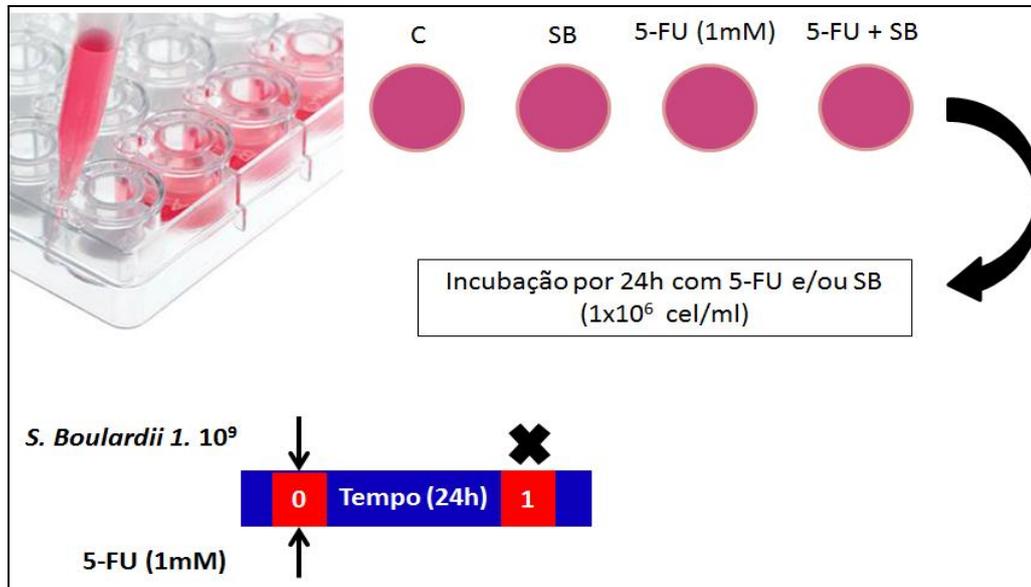


FIGURA 12 – Esquema da indução da mucosite por 5-fluorouracil e tratamento com *Saccharomyces boulardii* em células Caco2

4.9 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL E TRATADOS COM *Saccharomyces boulardii*

a) Avaliação Ponderal

Os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em variável de peso, em relação ao peso inicial.

b) Contagem Sanguínea de Leucócitos Totais

O número total de leucócitos plasmáticos foi determinado para verificar o efeito do 5-Fluorouracil na indução da leucopenia. Os animais foram levemente anestesiados com

tribromoetanol para coleta do sangue do plexo retro-orbital, e em seguida realizou-se a contagem de leucócitos totais no contador automático de células (Coulter Ac.T). Os resultados foram expressos como número de células $\times 10^3/\mu\text{L}$. Adicionalmente, a contagem do número total de leucócitos foi realizada em todos os experimentos com o auxílio da câmara de Neubauer. Essa observação serviu como controle do efeito imunossupressor do 5-Fluorouracil sobre o animal.

c) Avaliação da Diarreia

Os animais foram tratados conforme protocolo de indução da mucosite por 5-Fluorouracil, já citado anteriormente, e foram sacrificados no quarto dia experimental, e um segmento de 10cm do íleo terminal foi retirado e rapidamente estendido e isoladas as extremidades, por amarração com fio cirúrgico, para conter o extravazamento das fezes, foram feitas fotos para posteriores análises da estrutura das fezes dentro de cada segmento.

d) Histopatologia do Intestino Delgado

Os segmentos obtidos do jejuno e íleo foram fixados em formol a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 μm de espessura e fixados em hematoxilina e eosina. Posteriormente, com o auxílio de um microscópio ótico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (*MOTIC IMAGES PLUS 2.0*), um histopatologista (PMGS) que não conhecia os tratamentos realizados analisou todas as lâminas.

e) Determinação da infiltração de neutrófilo através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino (jejuno, íleo) de animais após a indução da mucosite por 5-Fluorouracil foi determinada pelo ensaio da atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Uma porção de intestino (previamente perfundido com salina) foram coletadas e incubadas em 200 μL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos

foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “*pellet*” foi ressuspensão em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante do intestino foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1 x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 µL). Determinou-se a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO *et al*, 2006).

4.10 EFEITO DO *Saccharomyces boulardii* NA AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS, DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR (NF-κB E MAPK), DA PROTEÍNA ADAPTADORA MyD88 E DOS RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR2 E TLR4) NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5- FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS E, EM CÉLULAS CACO2 INCUBADAS COM 5-FLUOROURACIL.

a) Imunohistoquímica para o Fator de Transcrição NF-κB, iNOS, MAPK (phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK), MyD88, TLR2 e TLR4

Os animais receberam salina ou 5-FU ou 5-FU+SB e foram sacrificados por deslocamento cervical no quarto dia experimental. Amostras de jejuno e íleo foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70%. Posteriormente foram desidratadas em álcool e xilol, e então parafinizadas. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 3 a 4 micrometros (µm) de espessura com o auxílio de um micrótomo e as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 15 min. As seções de tecidos foram montadas em lâminas silinizadas especiais para imunohistoquímica.

As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. Após a hidratação as peças foram imersas em tampão citrato 0,1 M (pH 6.0), seguida da ativação antigênica (~100 °C por 18 min). Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 15 min. Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas com PBS 0,01M (5 min.), seguido por glicina 0,1M em PBS (5 min.) e PBS 0,01M (5 min.). As lâminas foram então mergulhadas numa solução de PBS com albumina bovina (BSA) a 1%, durante 30 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-NFκB, iNOs, MyD88, pERK1/2, pp38, pJNK, TLR2, TLR4) provenientes da empresa Santa Cruz Biotechnology ou abcam na diluição de 1:100 em BSA 1%, overnight a 4°C. O controle negativo (background) não recebeu anticorpo primário. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS-BSA 1% e incubadas com o anticorpo secundário (30 min) marcado com biotina (anticorpo anti- Ig-G de camundongo) da Santa Cruz Biotechnology, na diluição de 1:1000, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, as lâminas foram incubadas com o complexo estreptoavidina- biotina-peroxidase diluído em PBS, por 35 minutos, à temperatura ambiente. Após a lavagem com PBS, a reação foi revelada utilizando diâmino-benzidina- peróxido de hidrogênio em PBS, à temperatura ambiente, por 5 min., no escuro. Após controle da intensidade, a reação foram interrompida pela lavagem com água corrente por 5 min. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Mayer, por 45 segundos, sendo o excesso retirado com água corrente. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em hidróxido de amônia a 0,5%, por 10 segundos e lavadas novamente em água destilada. Finalmente, as mesmas foram submetidas à desidratação com álcool 95%, álcool absoluto, xilóis e montadas com lamínulas em *Entellan* (RIBEIRO *et al*, 2002). A quantificação das imagens foi realizada pelo programa *Image J* com extensão *FIJI* com a representação dos dados em % área imunomarcada/área total.

b) Avaliação da expressão do Fator de Transcrição NF-KB e MAPK (phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK) por eletroforese em gel de poliamida, técnica de Western Blotting em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil e/ou *S. boulardii*

Para avaliar a expressão do NF-κB e phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK, foram utilizadas células Caco2 com 80 - 90% de confluência em placas de 6 poços. Após o tratamento com 5-Fluorouracil (1 mM) durante 24h, na presença, ou não, de *S. boulardii* (1.10⁹ UFC/ml). Após o período, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células

retiradas e lavadas três vezes com PBS estéril, a 4°C. As células foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -86°C até o momento de extração das proteínas totais, que é feita utilizando-se um tampão de lise com inibidores de proteases (Trinton X-100 1%, Nonidet P-40 0.2%, 250µl NaF, 125µl NaPPi, 50µl AEBSF, 25µl Glycero-phosphate, 1µl Aprotinine, 5µl Leupeptine, 10µl Pepstatine) e com o mesmo tampão de lise com inibidores de proteases as células são sonificadas e transferidas posteriormente para tubos de 2ml (marca eppendorf) e centrifugadas a 14000 rpm a 4°C. A concentração proteica do sobrenadante foi determinada pelo kit Biorad DC em placa de 96 poços com leitura em espectrofotômetro (absorbância de 630nm) e os resultados dados como µg /µl de proteína.

Foi padronizada a quantidade presente de proteína para 100µg/mg de células, de acordo com uma curva padrão para proteína nas especificações contidas no *kit*. Os lisados foram congelados a -86° C até a análise. Em seguida, foi realizada a separação eletroforética (*Bio Rad mini-gel*) das amostras após desnaturação (por meio de ebulição) em gel de poliacrilamida 12% (*SDS - Page*), com o marcador de proteína (*Invitrogen*). O gel foi então transferido para uma membrana de *PVDF* em aparelho de transferência na voltagem máxima e 450mA (*Bio Rad mini-transfercell*) durante 3h30 a 4° C. Após, a membrana de celulose foi bloqueada com leite desnatado 5% ou BSA 5% por 1 hora, a fim de bloquear outras proteases, seguida de incubação com anticorpo primário (anti-NF-κB, anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-p38, anti-phospho-JNK) over night, diluição 1:800 em BSA 5%. Após lavagens com tampão, foi feita incubação com anticorpo secundário provenientes da *Invitrogen*, diluído 1:1000 em leite desnatado ou BSA 5%, durante 1 hora, em plataforma oscilante. Depois de lavar com o tampão de lavagem, foi feita a revelação da membrana pela técnica de *ECL*, em aparelho FujiLab (LAS3000), com posterior leitura e o diagnóstico da densidade das bandas (Multi Gauge V3.0).

c) Avaliação da expressão de IK-B, TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN-γ, iNOS, TLR2 e TLR4 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil e/ou *S. boulardii*, através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para avaliar a expressão do mRNA para IK-B, TNF-α, IL-1β, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12, IFN-γ, iNOS, TLR2 e TLR4 foi utilizada a técnica de qPCR (quantitativo em tempo real), e foram utilizadas células com 80- 90% de confluência em placas de 6 poços. Após o tratamento com 5-Fluorouracil (1 mM) durante 24h, na presença ou não de *S. boulardii* (1.10⁹ UFC/ml) (para a análise dos receptores Toll-like foi adicionado o Lipopolissacarídeo de *E.*

Coli na dose de 1µg/ml), o sobrenadante da cultura foi descartado e as células lavadas três vezes com PBS estéril, a 4°C. As células foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -86°C até o momento de extração do RNA total. A extração do RNA total foi realizada nas células Caco2 pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987). O RNA foi convertido em cDNA, utilizando-se oligo (dT) 18 em 20 ml de solução de reação para transcrição reversa (Fermentas) e depois usada para a reação em cadeia da polimerase. O cDNA foi amplificado utilizando-se o kit SYBR Green para PCR (Eurogentec), em placas ópticas de microtitulação de 96 poços (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), em um sistema de detecção StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Os sinais de fluorescência foram gerados a cada ciclo de PCR, pela incorporação direta do SYBR Green na dupla fita de DNA, para gerar as informações do PCR quantitativo em tempo real. As condições do PCR foram: 10 min a 94°C e 40 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C para cada amplificação, num volume final de 20 ml.

O gene de referência 18S foi usado para todos os cálculos, uma vez que ele não apresenta mudança na sua expressão durante o tratamento das células. Os valores foram expressos como “fold increased” em relação ao controle negativo.

d) Avaliação da expressão de Citocinas (TNF- α , IL-1 β e CXCL-1) dos segmentos intestinais dos animais tratados com 5-Fluorouracil e/ou *S. boulardii*

A concentração de TNF α , IL-1 β e CXCL-1 foram determinadas nos fragmentos do jejuno e íleo congelados no freezer à -80°C. Estes foram homogeneizados em solução tampão de PBS com anti – proteases, a amostra foi centrifugada por 10 min em 3000 rpm e o sobrenadante foi imediatamente coletado para dosagem de TNF α , IL-1 β e CXCL-1. A detecção das concentrações dessas citocinas foi realizada por ELISA espécie - específica, conforme orientação do fabricante (R&D system). Os resultados foram expressos em pg/ml a partir de uma curva padrão fornecida pelo fabricante.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (Erro Padrão da Média), para as variáveis com distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal.

A análise estatística entre os grupos realizou-se empregando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos, baseando-se na continuidade das variáveis em análise, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o Software GraphPad Prism®, versão 5.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DO *Saccharomyces boulardii* NOS PARÂMETROS GERAIS E INFLAMATÓRIOS DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS.

Inicialmente, induziu-se a mucosite intestinal através da administração de 5-fluorouracil (5-FU) na dose única de 450 mg/Kg, intraperitoneal e administrou-se via oral, por gavagem, o *Saccharomyces boulardii* (1.10^9 UFC/ml), por 3 dias consecutivos. Ao longo do período de indução da mucosite, realizou-se a análise da curva ponderal. No quarto dia após a administração única do 5-FU (primeiro dia experimental), analisou-se a contagem sanguínea de leucócitos, e então os animais foram sacrificados para análise dos parâmetros gerais da mucosite, incluindo a análise da diarreia, histopatologia (jejuno e íleo) e dosagem de mieloperoxidase.

A Figura 13 ilustra que o 5-FU promoveu uma significativa ($P < 0,05$) perda ponderal, já no primeiro dia experimental, quando comparado ao grupo controle tratado apenas com salina. Os animais tratados com 5-FU + SB tiveram uma perda de peso significativamente reduzida em relação ao grupo tratado somente com 5-FU (5-FU + SB: $2,51 \pm 0,46\%$), no primeiro dia experimental. Observou-se ganho de peso corporal no grupo controle e no grupo SB durante todo o período experimental, sendo o ganho máximo no quarto (último) dia do experimento (C: $8,497 \pm 0,48\%$; SB: $8,815 \pm 1,46\%$). O grupo 5-FU teve uma perda de peso de $9,75 \pm 0,58\%$ no último dia do experimento em relação ao primeiro dia.

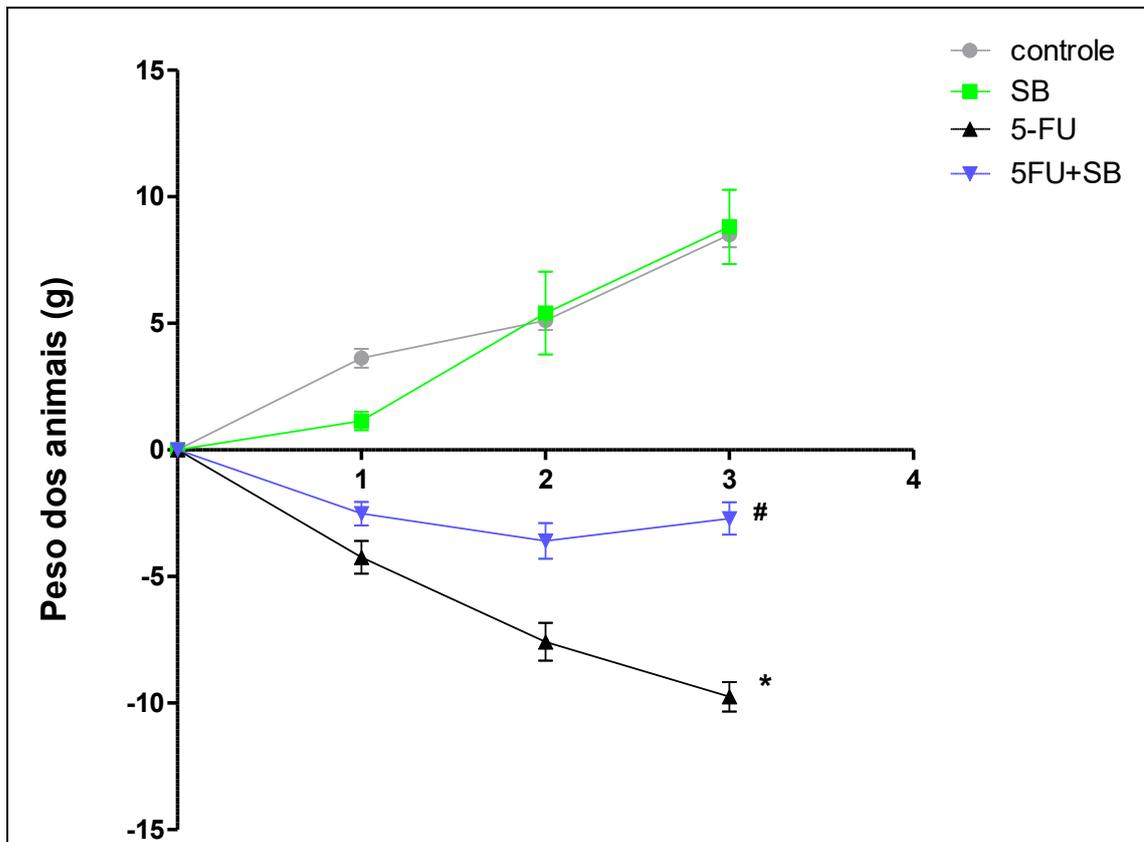


FIGURA 13 – Efeito do *Saccharomyces boulardii* na variação de peso corporal nos grupos experimentais. No primeiro dia experimental todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg). Os animais foram tratados com *S. boulardii* (1.10^9 UFC/Kg) durante três dias consecutivos. Os animais foram pesados diariamente durante todo o experimento. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle/salina (C), # $p < 0,05$ comparados com o grupo 5- FU + salina, pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

Adicionalmente, verificou-se (Figura 14) que o 5-FU induziu uma diarreia observada no segmento ileal, e, o grupo tratado com 5-FU+SB reverteu esse quadro diarreico quando comparado ao grupo tratado somente com 5-FU. Na Tabela 1 observa-se que o 5-FU induziu uma significativa ($P < 0,05$) leucopenia no último dia experimental (68 %) quando comparado ao grupo salina.

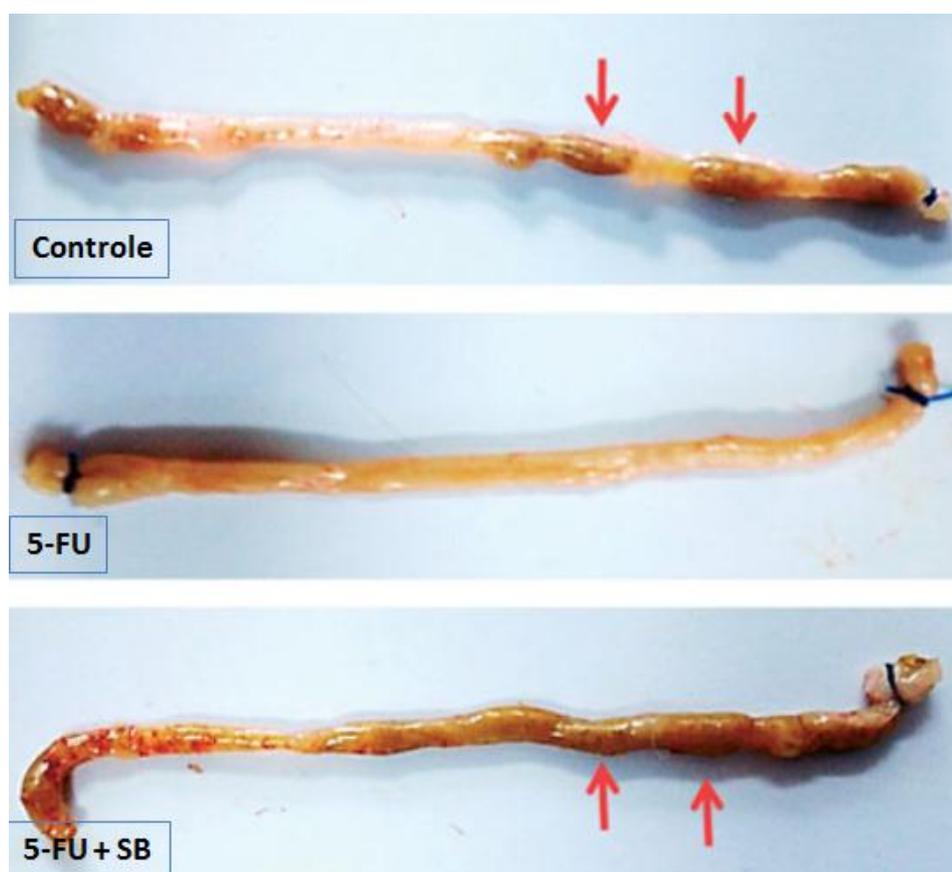


FIGURA 14 – Efeito do *Saccharomyces boulardii* na diarreia nos grupos experimentais.

No primeiro dia experimental todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg). Os animais foram tratados com *S. boulardii* (1.10^9 UFC/Kg) durante três dias consecutivos. No quarto dia experimental os animais foram sacrificados e 10cm do segmento final do íleo foi retirado para avaliação da diarreia.

TABELA 1 – *Saccharomyces boulardii* não altera a leucopenia induzida por 5-FU

| GRUPOS EXPERIMENTAIS (n=8) | n° células/mm³ |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| CONTROLE (salina) | 5289,00±851,80 |
| 5-FU + SALINA | 1675,00±138,90 * |
| 5-FU + SB | 2825,00±303,30 |

A tabela apresenta o efeito do 5-FU em diminuir o número total de leucócitos circulantes, verificou-se a leucopenia no grupo tratado com 5-FU+salina e o grupo tratado com 5-FU + SB não apresenta leucopenia significativa. Os valores representam a média ± E.P.M. * p <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). ANOVA e teste de Bonferroni.

Após, as amostras armazenadas de intestino (jejuno e íleo) foram utilizadas para análise histopatológica. Observa-se que o 5-FU promoveu uma redução dos vilos em todos os segmentos intestinais avaliados quando comparado ao grupo salina. As referidas alterações estão evidenciadas nas fotomicrografias do jejuno (Figura 15) e íleo (Figura 16) em que se verificaram uma destruição da arquitetura dos vilos e criptas, presença de células polimorfonucleares e necrose de células da cripta versus o grupo salina. Observamos que o tratamento de 5-FU+*SB* reverteu essas alterações induzidas por 5-FU, no jejuno (Figura 15 – G,H) e no íleo (Figura 16 – G,H).

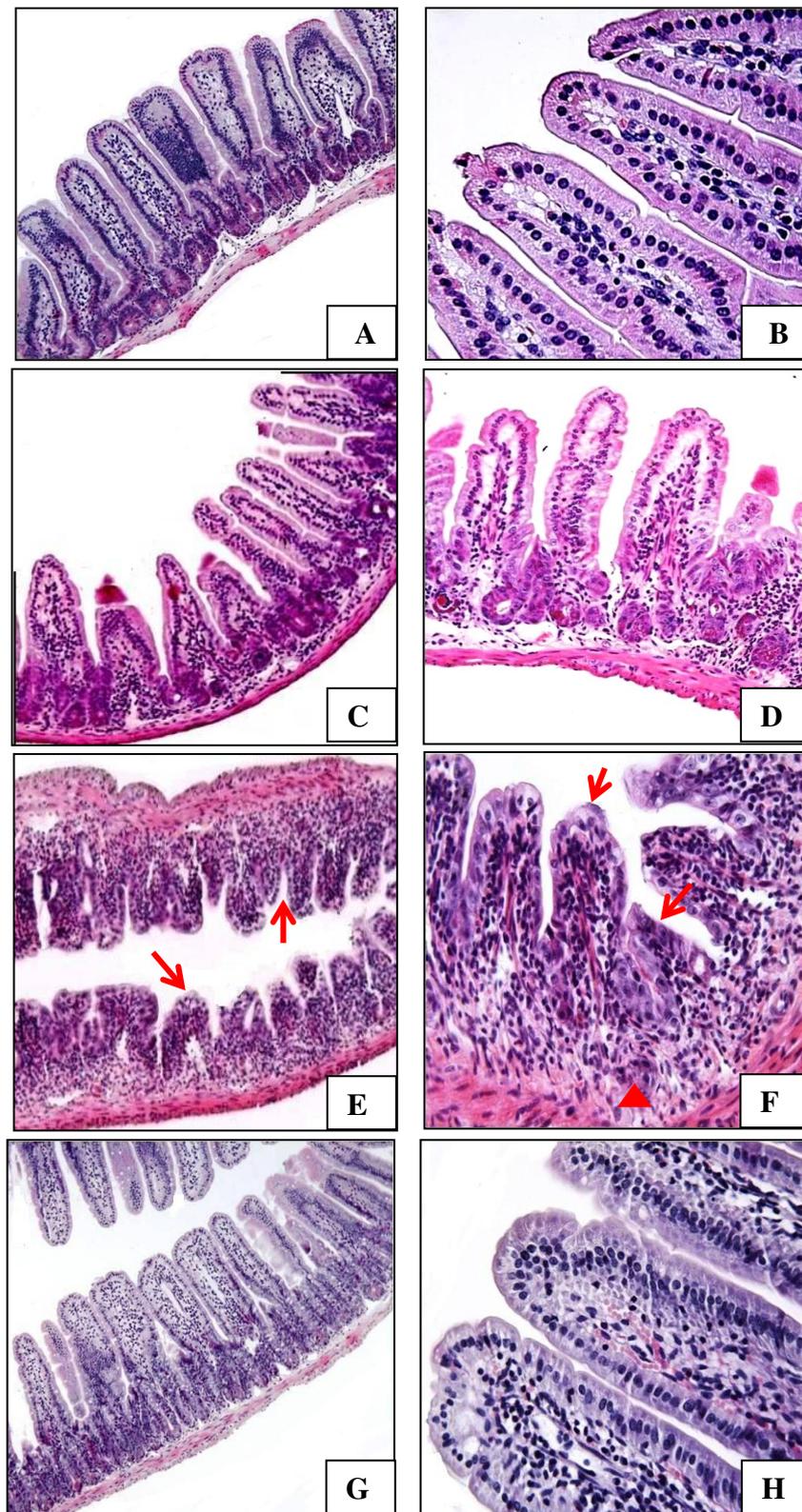


FIGURA 15 – Fotomicrografias de amostras do jejuno após a administração de *Saccharomyces boulardii* na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. (A, C, E, G) - Fotomicrografias (100X) do jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (C), 5-FU+salina (E), 5-FU+SB (G). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (G) revertem o encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas induzidos por 5-FU (E, setas). (B, D, F, H) – Fotomicrografias (400X) do jejuno de camundongos tratados com salina (B), SB (D), 5-FU+salina (F), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) revertem o intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema na mucosa e na camada muscular, induzidos por 5-FU (F, cabeça de seta).

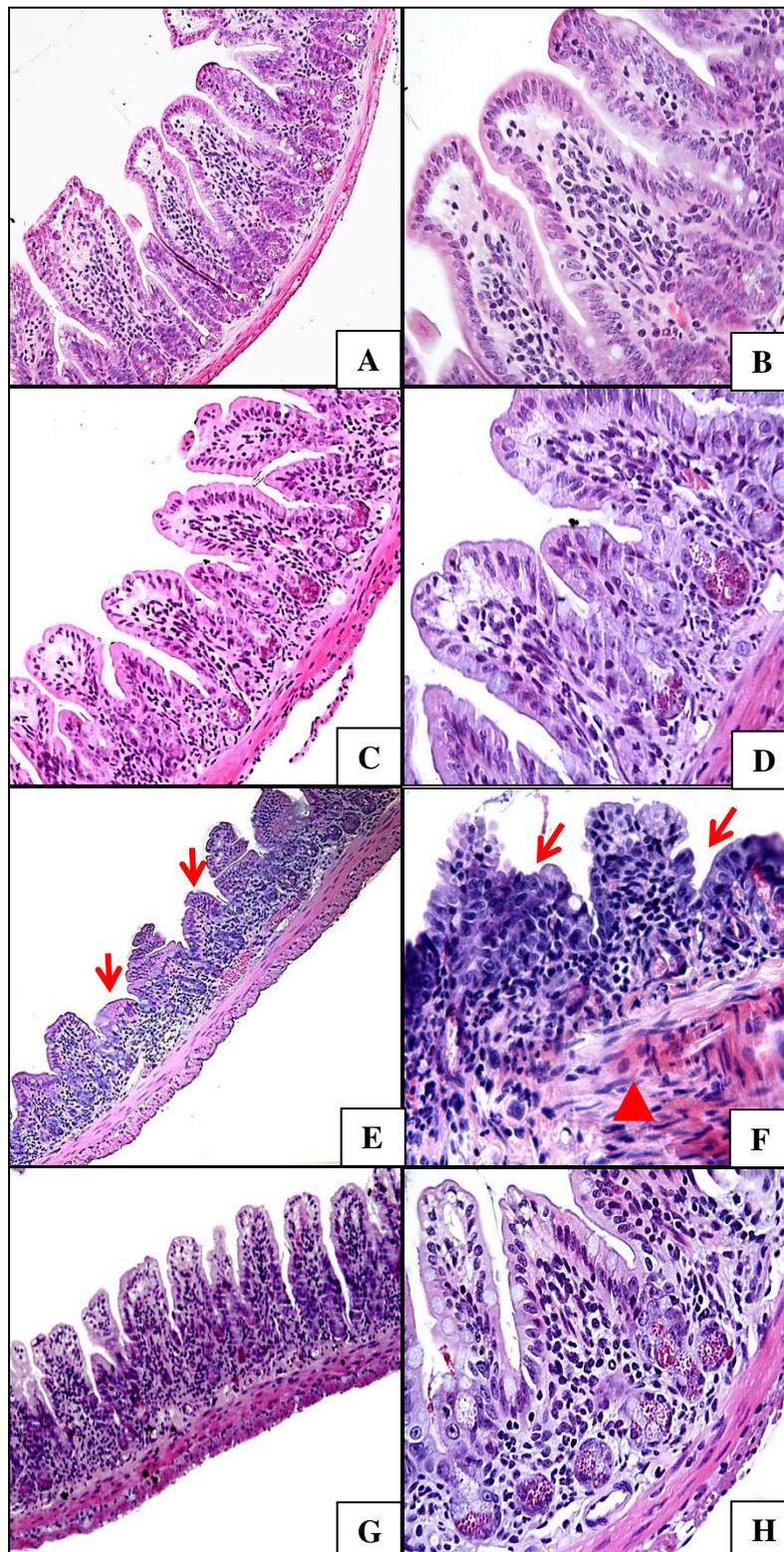


FIGURA 16 – Fotomicrografias de amostras do íleo após a administração de *Saccharomyces boulardii* na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. (A, C, E, G) - Fotomicrografias (100X) do jejunum de camundongos tratados com salina (A), SB (C), 5-FU+salina (E), 5-FU+SB (G). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (G) revertem o encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas induzidos por 5-FU (E, setas). (B, D, F, H) – Fotomicrografias (400X) do jejunum de camundongos tratados com salina (B), SB (D), 5-FU+salina (F), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) revertem o intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema na mucosa e na camada muscular, induzidos por 5-FU (F, cabeça de seta).

A Figura 17 demonstra que a administração de 5-FU induz um aumento significativo ($P < 0,05$) do infiltrado neutrofilico no jejuno ($5,87 \pm 1,06$ UMPO/mg) e no íleo ($14,09 \pm 2,99$ UMPO/mg), com valores 2 e 8 vezes maiores (238,6% e 828,5%), respectivamente, quando comparados aos segmentos dos animais controle (100%) (jejuno: $1,73 \pm 0,36$ UMPO/mg e íleo: $1,51 \pm 0,17$ UMPO/mg). O tratamento com 5-FU+SB reduziu a infiltração neutrofilica no jejuno (5-FU+SB: $3,08 \pm 0,46$ UMPO/mg), e também no íleo (5-FU+SB: $3,67 \pm 0,85$ UMPO/mg), quando comparados aos animais que receberam somente 5-FU.

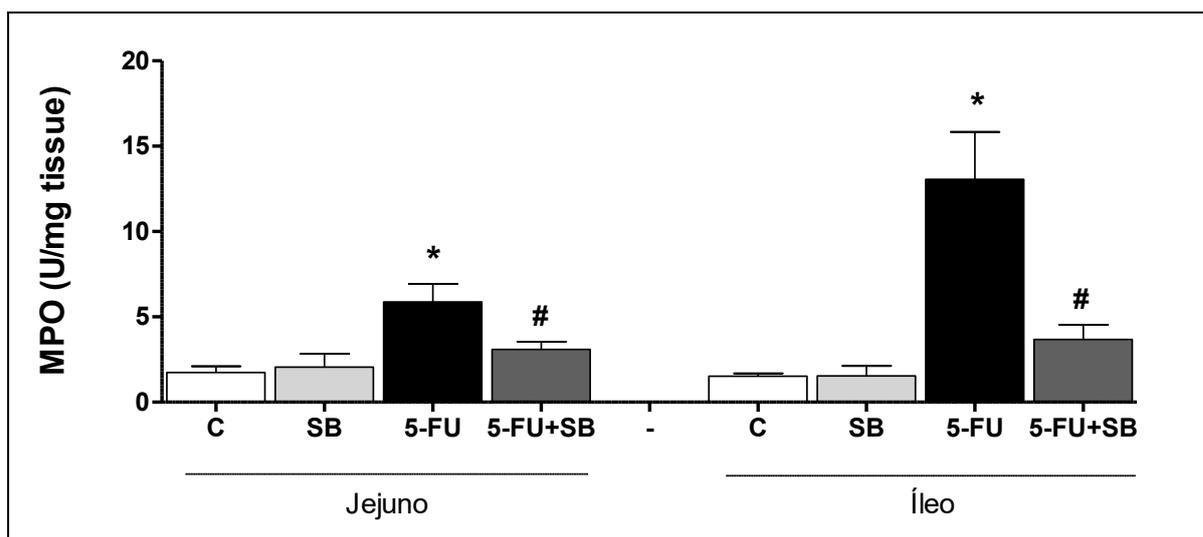
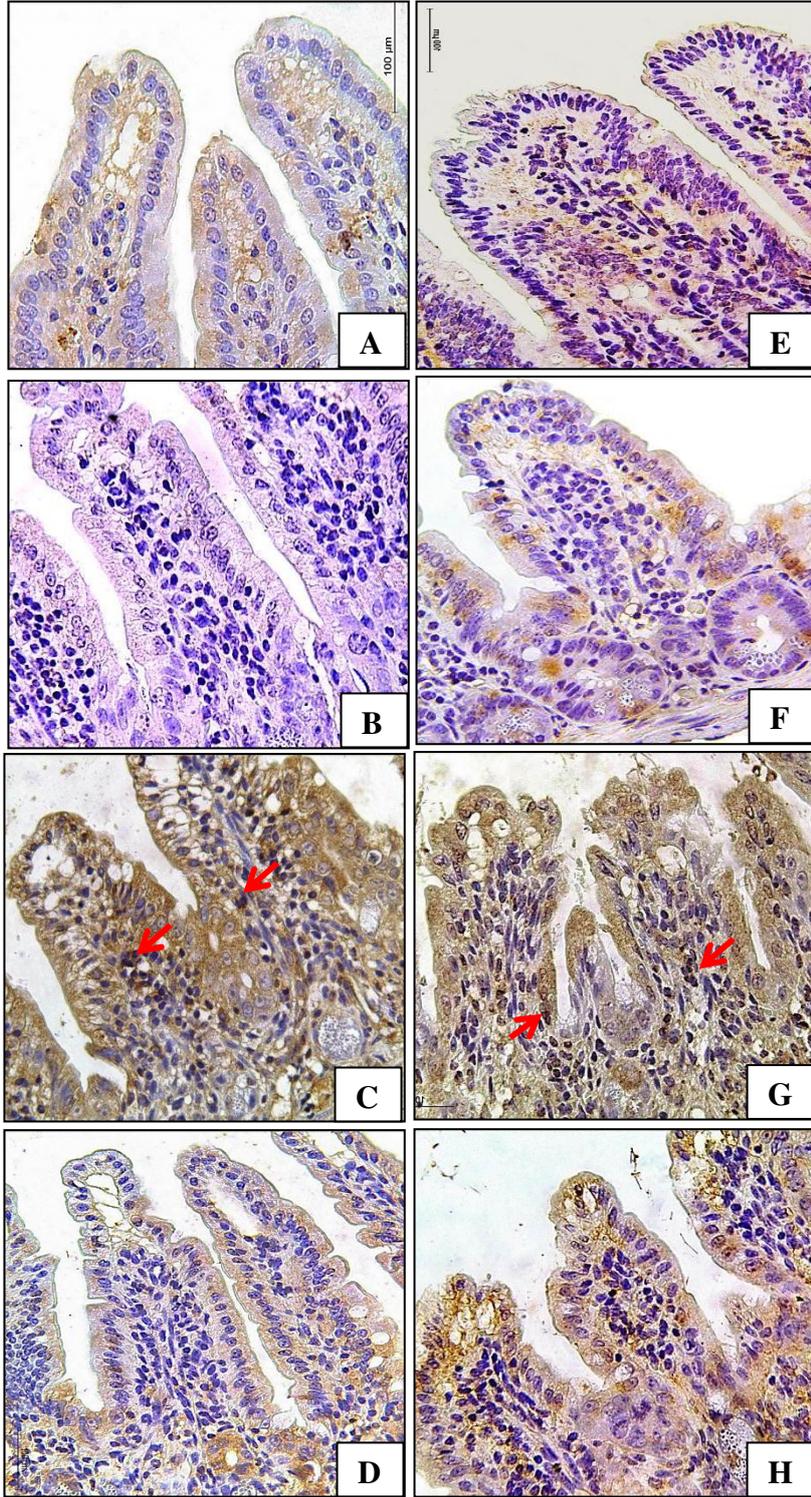


FIGURA 17 – Efeito do *Saccharomyces boulardii* na infiltração neutrofilica causada na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p) ou 5-FU (450 mg/kg, i.p.) no primeiro dia experimental e foram tratados com SB (1.10^9 UFC/Kg, gavagem) ou salina durante três dias consecutivos e foram sacrificados no quarto dia experimental. Segmentos do jejuno e íleo foram obtidos para a realização do ensaio da atividade de MPO. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. ($n = 8$). Significância ($P < 0,05$), * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

5.2. EFEITO DO *Saccharomyces boulardii* NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR (NF- κ B e MAPK) NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS E, EM CÉLULAS Caco2 INCUBADAS COM 5-FLUOROURACIL.

Foi realizado o ensaio de imunohistoquímica para NF- κ B (Figura 18) dos segmentos de jejuno e íleo dos animais 3 dias após indução da mucosite por 5-FU tratados ou não com *S. boulardii*. A figura 18 (C e G) mostra que houve um aumento na imunomarcção para os animais tratados somente com 5-FU nos segmentos do jejuno e íleo, respectivamente, em relação ao controle jejuno e íleo, figura 18 (A e E) respectivamente. E os animais tratados com 5-FU+SB (D e H) reverteram essa imunomarcção, apresentaram uma redução na expressão de NF- κ B, tanto no jejuno como no íleo. E, os animais tratados somente com SB (B e F) não tiveram alterações.

Na porcentagem das áreas imunomarcada, observou-se um significativo aumento ($P < 0,05$) da imunomarcção no grupo tratado somente com 5-FU nos segmentos do jejuno ($6,8 \pm 0,2$ %) e íleo ($7,2 \pm 0,5$ %), respectivamente, quando comparados ao grupo controle jejuno ($2,2 \pm 0,5$ %) e íleo ($2,9 \pm 0,3$ %). O grupo tratado com 5-FU+SB reduziu essa imunomarcção quando comparados com o grupo tratado somente com 5-FU, tanto no jejuno ($3,7 \pm 0,1$ %) como no íleo ($3,0 \pm 0,2$ %).



JEJUNO

ÍLEO

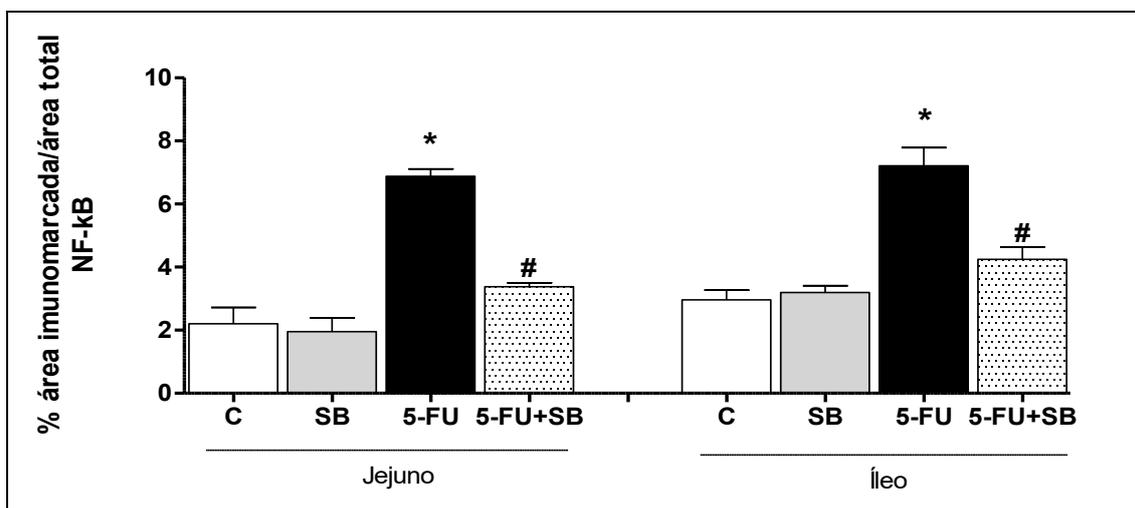


FIGURA 18: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de NF-kB nos segmentos do Jejuno e Íleo imunomarcados de camundongos incubados com 5-FU. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do Íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada para NF-kB. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

Para complementar, analisamos a expressão de NF-kB pelo método western blotting em células Caco2 incubadas com 5-FU (1mM) e/ou SB (1.10⁹ UFC/ml). E, observou-se que há um aumento de 290,6 % da expressão de NF-kB no grupo de células Caco2 incubadas somente com 5-FU (4.192 ± 0.57) quando comparados ao grupo controle (1.073 ± 0.06), e que no grupo de células incubadas com 5-FU+SB (1.117 ± 0.16) reduziu em 73,3 % em relação ao grupo 5-FU sozinho (Figura 19).

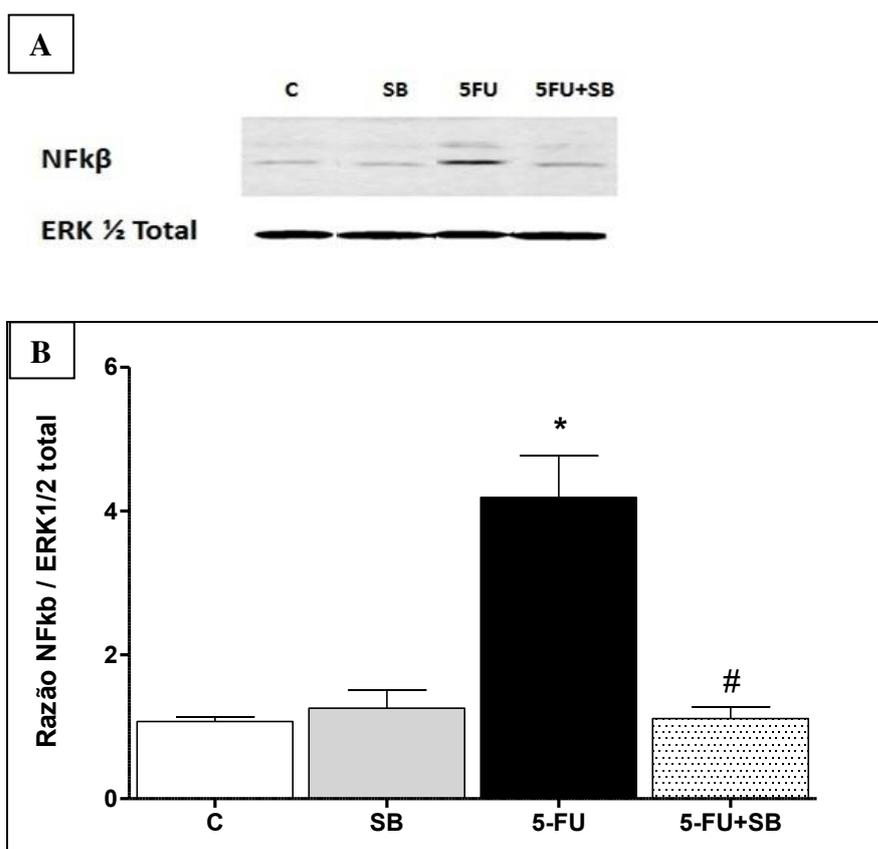


FIGURA 19: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de NFκB em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. As células foram lisadas após 24h da administração de 5-FU e/ou SB e as amostras foram corridas em SDS-PAGE e analisadas, por “imunoblotting”, com anticorpos anti-phospho-NFκB. C, controle; SB, *Saccharomyces boulardii*; 5-FU, 5-Fluorouracil.

E, analisamos também a expressão de mRNA para I κ B em células Caco2 incubadas com 5-FU e/ou SB. Observamos que as células incubadas com 5-FU sozinho tiveram uma baixa expressão de mRNA de I κ B (1.014 ± 0.32), assim como o grupo controle (1.150 ± 0.06), mas as células incubadas com 5-FU+SB (5.817 ± 0.29) tiveram um aumento de 473% da expressão do mRNA para I κ B quando comparadas ao grupo tratado somente com o 5-FU (Figura 20).

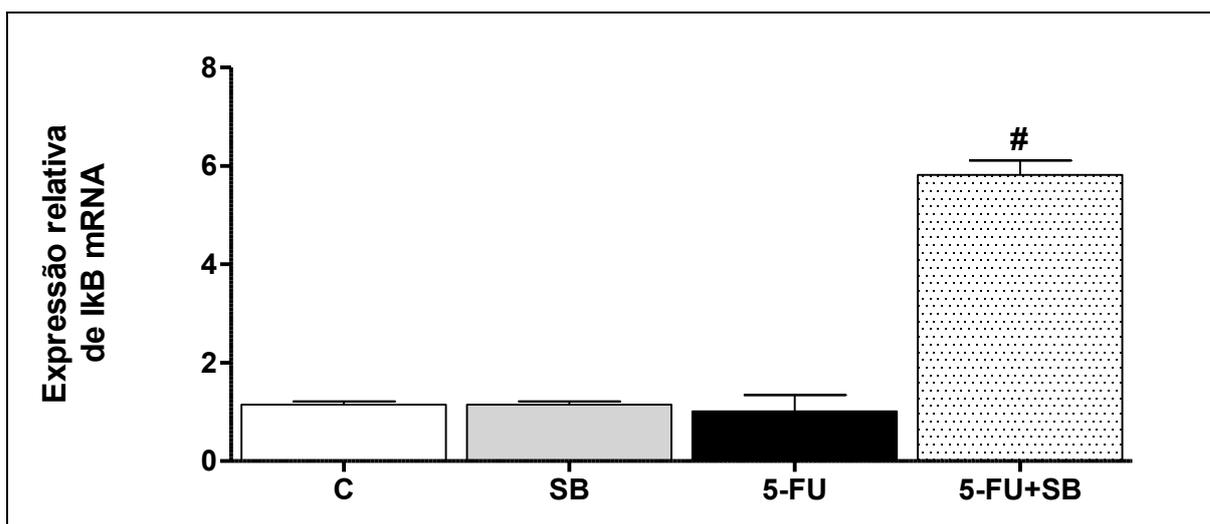


FIGURA 20: Efeito do *Saccharomyces boulardii* nos níveis de mRNA para I κ B em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. Efeito de *S. boulardii* (SB) nos níveis de mRNA para I κ B, induzidos por 5-FU, em células Caco2. mRNA para I κ B foi analisado nas células Caco2, por PCR quantitativo após 24h da administração do 5-FU na presença ou não de SB. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU ($n = 4$). C, controle; SB, *Saccharomyces boulardii*; 5-FU, 5-Fluorouracil.

Diversos trabalhos já mostraram que a secreção de citocinas pró-inflamatórias é dependente de fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1, assim como das MAP quinases (p38, ERK 1/2 e JNK) (HOBBIE *et al.*, 1997; CZERUCKA *et al.*, 2000; GEWIRTZ *et al.*, 2000; CZERUCKA *et al.*, 2001; DAHAN *et al.*, 2002; HOFFMANN *et al.*, 2002; DAHAN *et al.*, 2003). Baseado nessa informação avaliou-se o efeito do 5-FU na presença ou não de *S. boulardii* na indução de citocinas pró- inflamatórias, os animais foram tratados como já descrito anteriormente e, as citocinas dos segmentos intestinais (jejuno e íleo) foram dosadas por ELISA. As células Caco2 foram cultivadas em placas de 6 poços, incubadas com 5-FU na presença ou não de SB e analisadas por qPCR (PCR quantitativo em tempo real).

A figura 21 (A) mostra o efeito do SB na expressão de TNF- α no jejuno e íleo dos animais tratados ou não com 5-FU, após a indução da mucosite intestinal. Nos animais que receberam somente 5-FU, foi encontrado um importante aumento da expressão de TNF- α nos segmentos do jejuno ($2729,0 \pm 142,7$ U/mg) e do íleo ($2477,0 \pm 162,4$ U/mg) quando comparados aos segmentos dos animais controle (jejuno: $1521,0 \pm 28,6$ UMPO/mg e íleo: $1006,0 \pm 144,8$ U/mg).

O tratamento com 5-FU+SB reduziu a expressão de TNF- α no jejuno (5-FU+SB: $1307,0 \pm 85,0$ U/mg), e também no íleo (5-FU+SB: $1256,0 \pm 109,3$ U/mg), quando comparados aos animais que receberam somente 5-FU.

A figura 21 (B) mostra o efeito do SB na expressão de mRNA para TNF- α em células Caco2 incubadas com 5-FU, corroborando com os resultados nos animais, observou-se que também há um aumento de 30 vezes na expressão de mRNA para TNF- α nas células incubadas somente com 5-FU ($32,02 \pm 4,0$ U) quando comparadas ao grupo controle ($1,07 \pm 0,04$ U), e as células incubadas com 5-FU+SB ($1,99 \pm 0,16$ U) houve uma redução de 16,09 vezes dessa expressão.

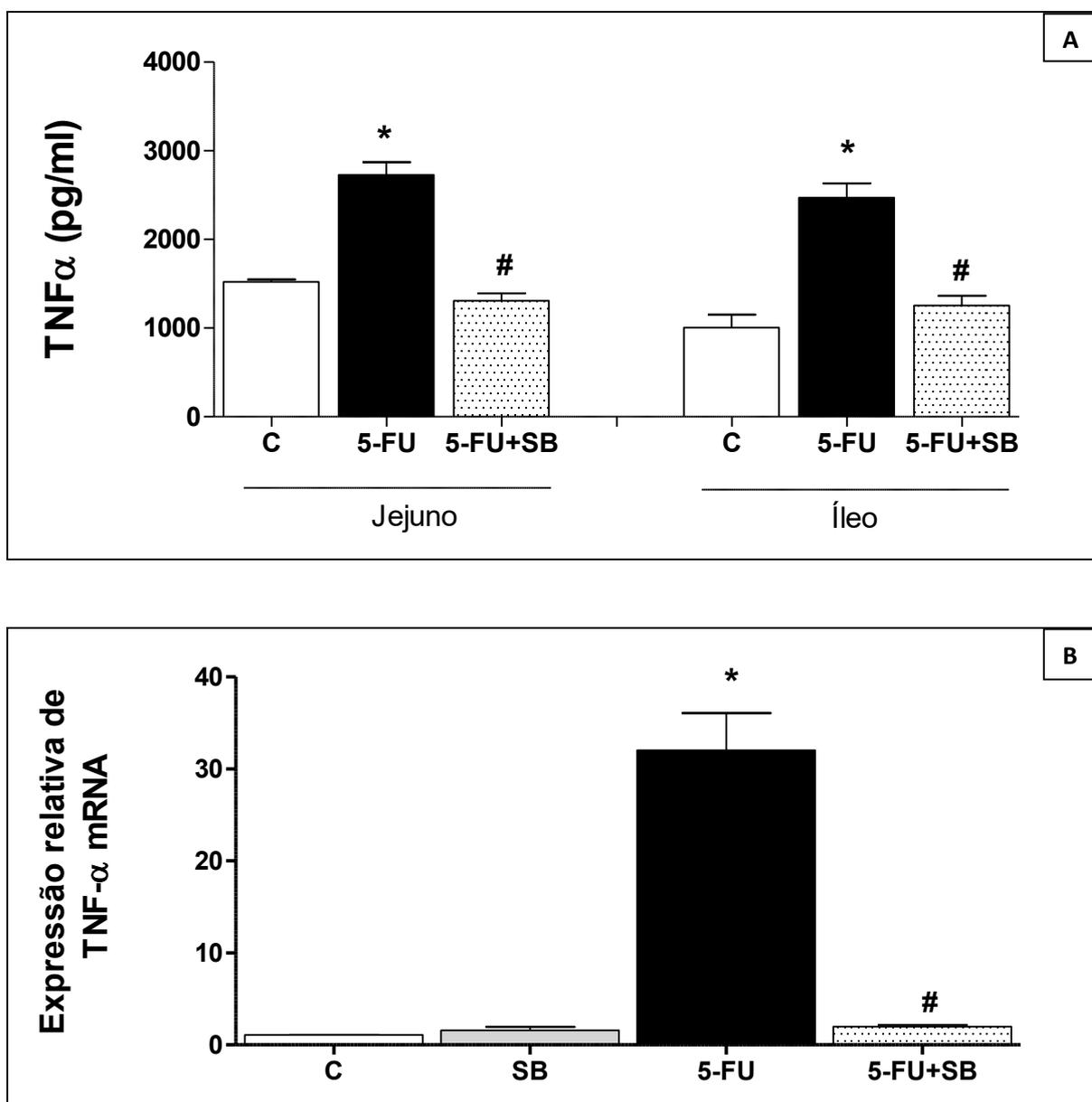


FIGURA 21 (A-B): Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de TNF- α em camundongos após a administração de 5-FU e, nos níveis de mRNA para TNF- α em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. (A) - Efeito do SB na expressão de TNF- α nos segmentos intestinais (jejuno e íleo) de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU. (B) - Efeito do SB nos níveis de mRNA para TNF- α , em células Caco2, incubados com 5-FU. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle, # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo 5-FU, $n = 4$. C, controle; SB, *Saccharomyces boulardii*; 5-FU, 5-Fluorouracil.

Na figura 22 (A) observa-se que o tratamento somente com 5-FU, no jejuno e íleo, induziu um aumento na concentração de IL-1 β (jejuno: 3405,0 \pm 272,1 pg/ml, referente a 81,79% e, no íleo: 2197,0 \pm 249,3 pg/ml, referente a 107,49%) quando comparados ao grupo controle (100%), observou-se ainda que o tratamento com 5-FU+SB reduziu significativamente, no jejuno, as concentrações de IL-1 β em relação aos tratados somente com 5-FU, nos animais tratados com 5-FU+SB essa redução foi de 58,59% (2178 \pm 295,3 pg/ml). Mas, na mucosa do íleo essa redução foi bem maior, para 5-FU+SB foi de 128,22% (839,3 \pm 79,85 pg/ml) quando comparados ao grupo 5-FU.

A figura 22 (B) correlaciona com o resultado anterior, a nível celular, pois mostra o efeito do SB na expressão de mRNA para IL-1 β em células Caco2 incubadas com 5-FU. Observou-se que há um aumento bastante significativo na expressão de mRNA para IL-1 β nas células incubadas somente com 5-FU (37,13 \pm 5,66 U), aumento de 36,4 vezes, em relação ao grupo controle (1,02 \pm 0,1 U), e as células incubadas com 5-FU+SB houve uma redução dessa expressão (10,71 \pm 2,95 U), redução de 3,45 vezes, quando comparadas ao grupo incubado somente por 5-FU.

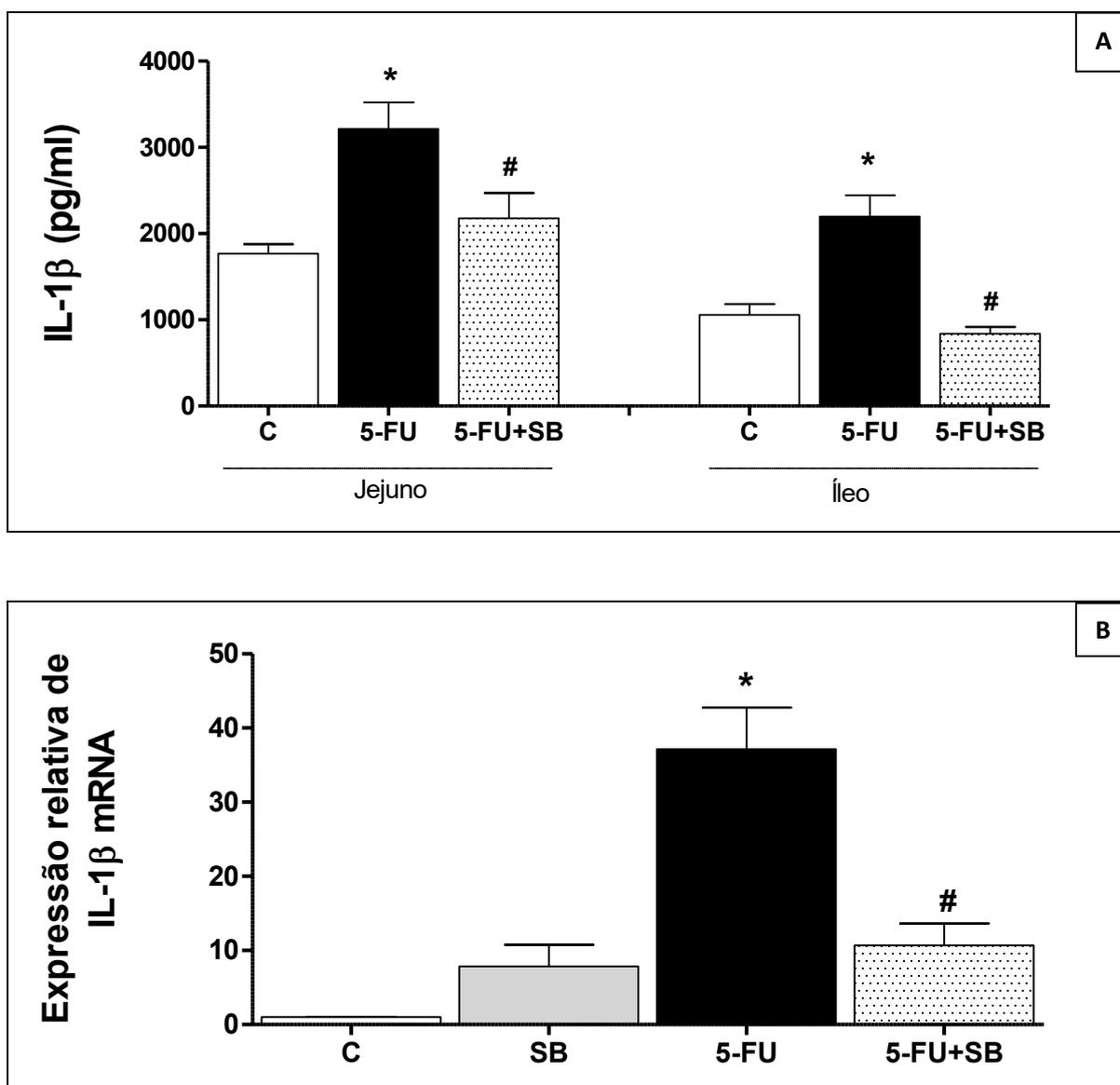


FIGURA 22 (A-B): Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de IL-1 β em camundongos após a administração de 5-FU e, os níveis de mRNA para IL-1 β em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. (A) - Efeito do SB na expressão de IL-1 β nos segmentos intestinais (jejuno e íleo) de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU. (B) - Efeito do SB nos níveis de mRNA para IL-1 β , em células Caco2, incubados com 5-FU. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle, # $P < 0,05$ quando comparado com o grupo 5-FU, $n = 4$. C, controle; SB, *Saccharomyces boulardii*; 5-FU, 5-Fluorouracil.

A figura 23 mostra que também ocorreu um aumento na expressão da quimiocina CXCL-1 nos animais tratados somente com 5-FU (jejuno: $1443,0 \pm 396,8$ pg/ml, referente a 5,8 vezes e, no íleo: $1991,0 \pm 837,5$ pg/ml, referente a 2,8 vezes) quando comparados ao grupo controle (1x). Observamos também que nos animais tratados com 5-FU+SB houve uma redução significativa na expressão tanto no jejuno dos animais 7,25 vezes ($198,9 \pm 151,5$ pg/ml), como no íleo, de 6,31 vezes ($376,6 \pm 107,1$ pg/ml) quando comparados ao grupo tratado somente com 5-FU.

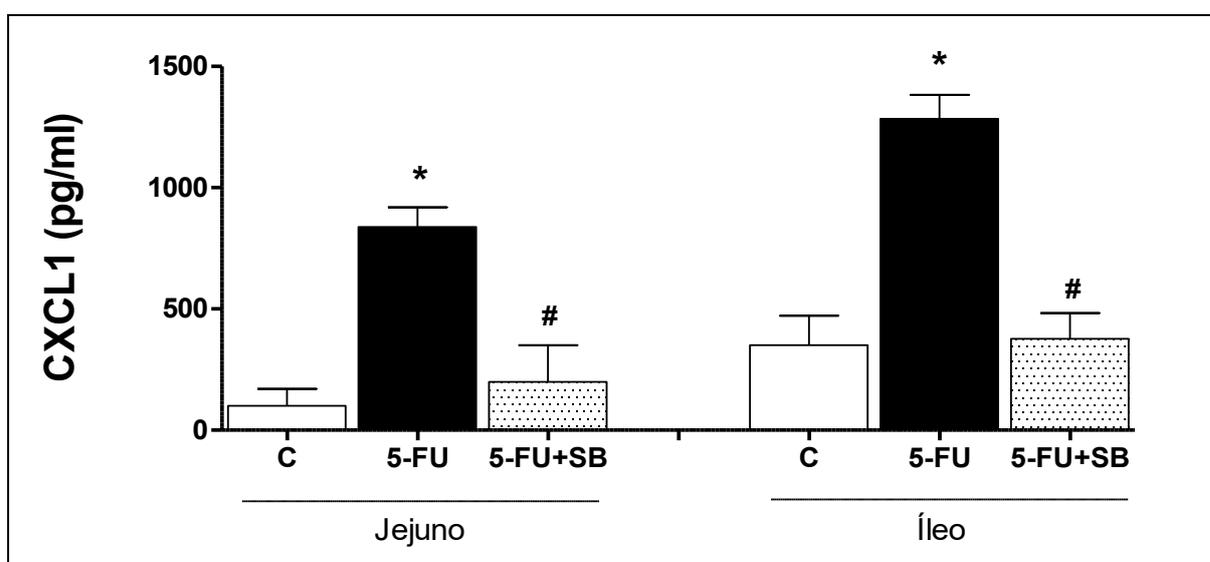


FIGURA 23: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de CXCL-1 em camundongos após a administração de 5-FU. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. ($n = 6$). Significância ($P < 0,05$), * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado somente com 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

E, na figura 24 observa-se o efeito do SB na expressão de mRNA para IL-8 em células Caco2 incubadas com 5-FU. Observou-se que há um aumento de 127 vezes na expressão de IL-8 nas células incubadas somente com 5-FU ($139,8 \pm 16,9$ U) quando comparadas ao grupo controle ($1,1 \pm 0,5$ U), e as células incubadas com 5-FU+SB ($7,9 \pm 1,2$ U) houve uma redução de 17,69 vezes quando comparadas ao grupo 5-FU.

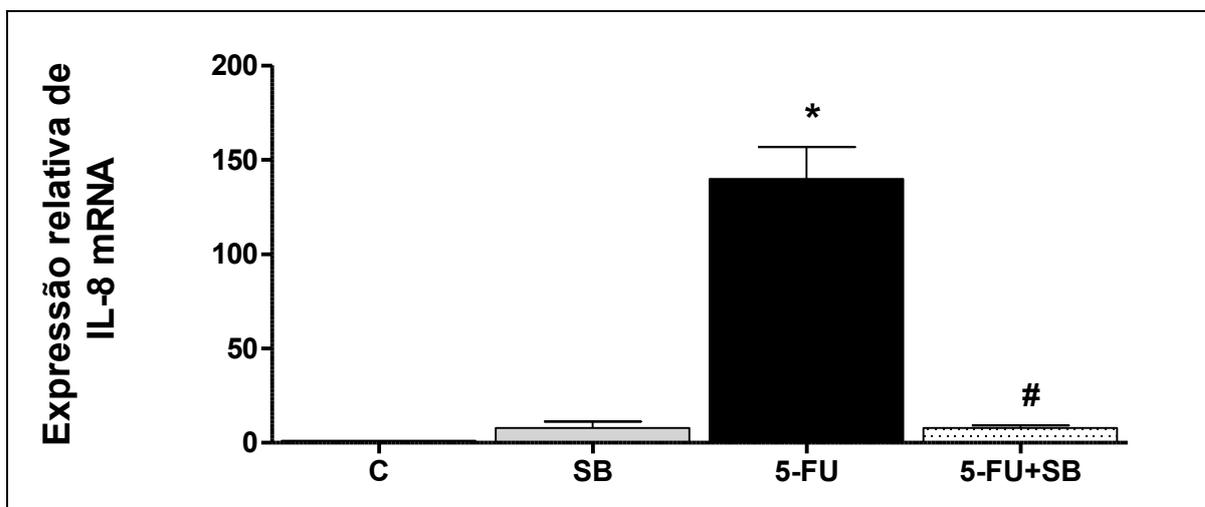


FIGURA 24: Efeito do *Saccharomyces boulardii* nos níveis de mRNA para IL-8 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. ($n = 3$). Significância ($P < 0.05$), * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado somente com 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

A figura 25 (A-D) mostra que o grupo de células Caco2 incubadas somente com 5-FU tem um aumento na expressão de 4,6 vezes para IL-4 (5-FU: $5,68 \pm 0,50$ U), 88,3 vezes para IL-6 (5-FU: $106,0 \pm 12,17$ U), 3 vezes para IL-12 (5-FU: $3,61 \pm 0,17$ U) e 14,5 vezes para IFN- γ (5-FU: $17,50 \pm 1,47$ U), quando comparados ao grupo controle (1 x). E, que os grupos celulares incubados com 5-FU+SB reverterem esse aumento de expressão em 2,24 vezes para IL-4 ($2,55 \pm 0,27$ U), 8,61 vezes para IL-6 ($12,34 \pm 1,39$ U), 3 vezes para IL-12 ($1,22 \pm 0,18$ U) e 5,46 vezes para IFN- γ ($3,24 \pm 0,80$ U) quando comparados ao grupo tratado somente com 5-FU.

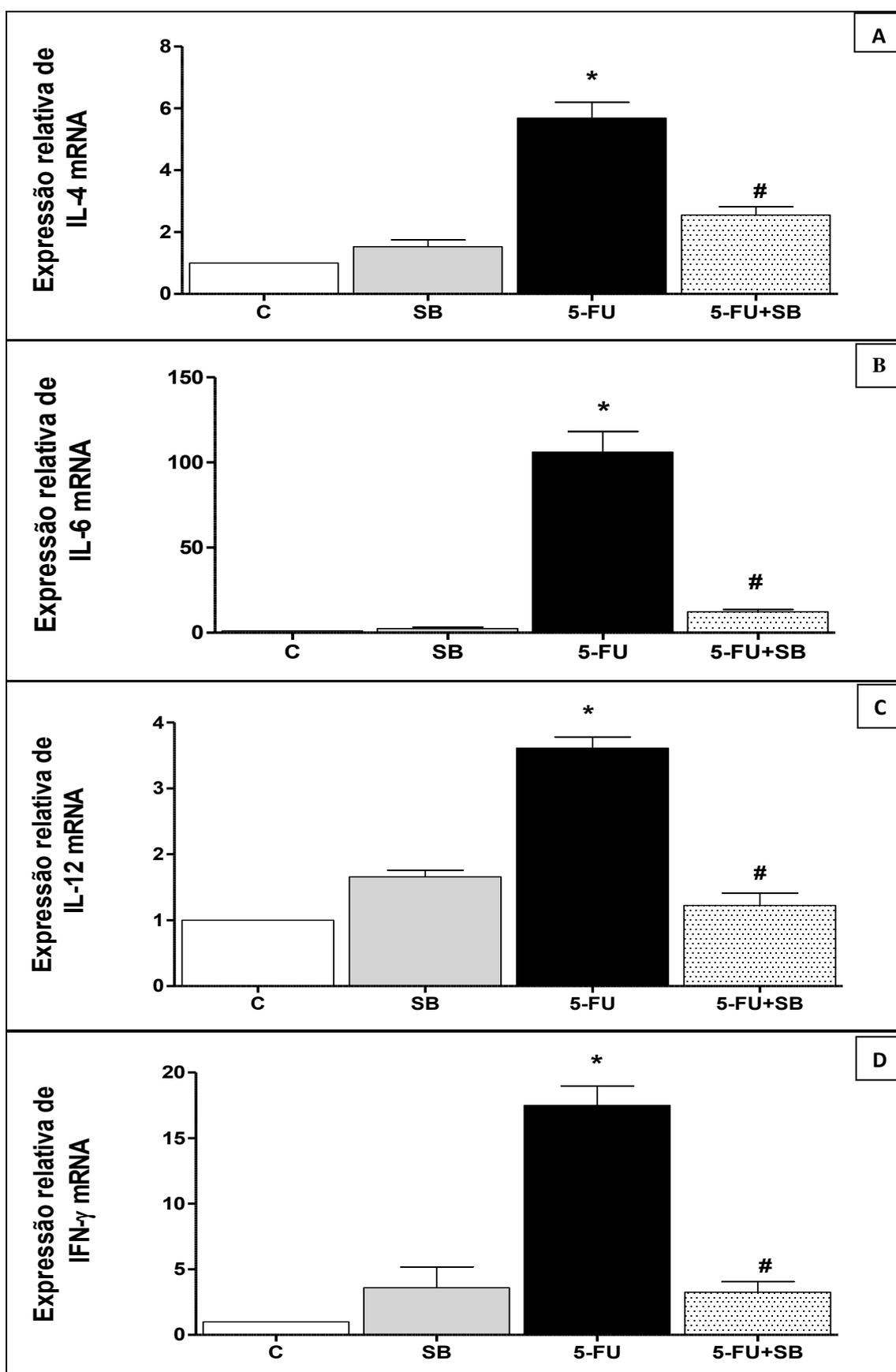
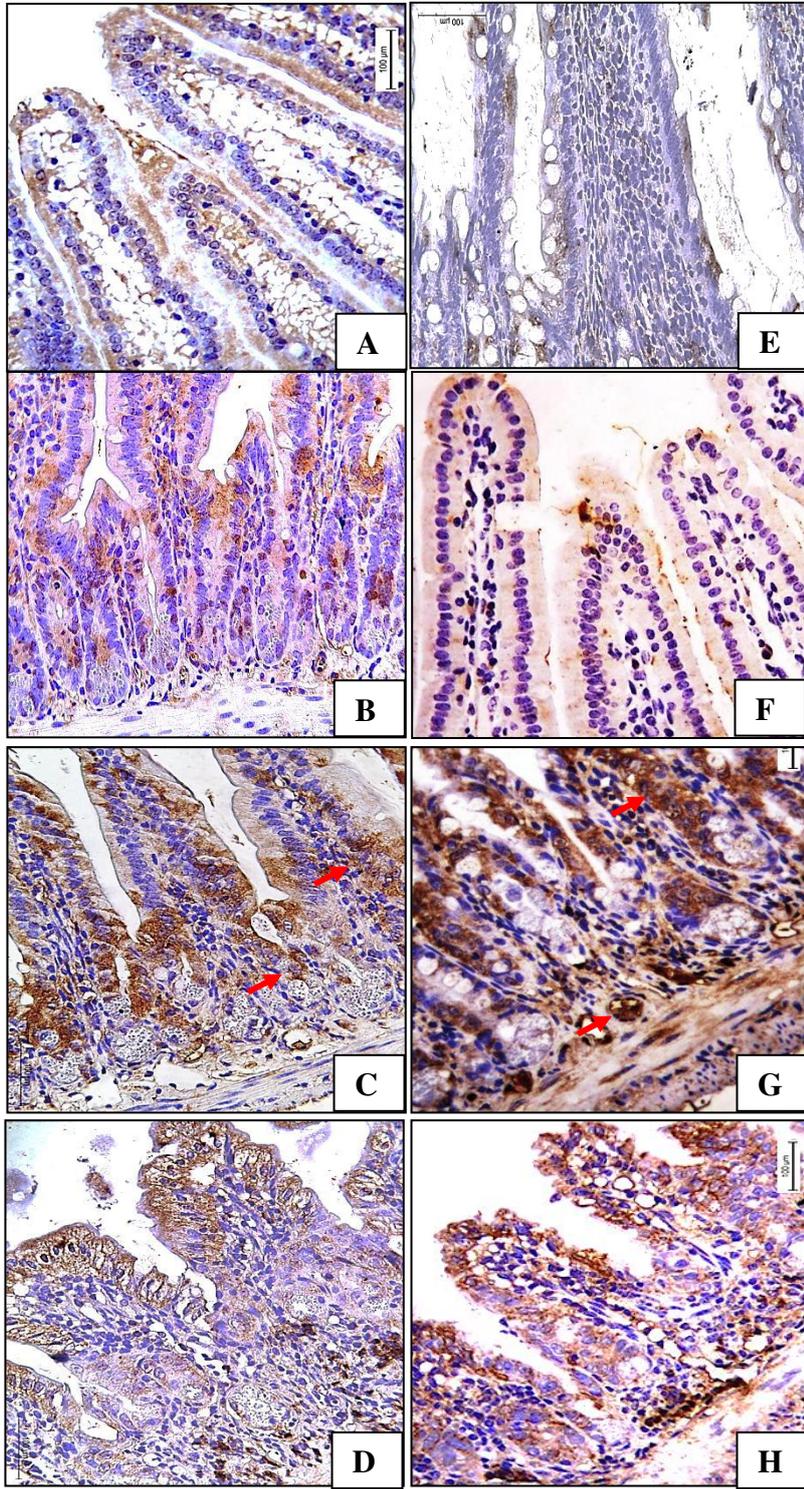


FIGURA 25 (A-D): Efeito do *Saccharomyces boulardii* nos níveis de mRNA para IL-4, IL-6, IL-12 e IFN- γ em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. (n = 3). Significância (P < 0.05), * P < 0,05 quando comparado ao grupo

controle (salina). # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado somente com 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5-Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*. **A:** qPCR para mRNA IL-4. **B:** qPCR para mRNA IL-6. **C:** qPCR para mRNA IL-12. **D:** qPCR para mRNA IFN- γ .

Na figura 26, foi realizado o ensaio de imunohistoquímica para enzima Óxido Nítrico Sintetase Induzível (iNOS) nos segmentos de jejuno e íleo dos animais 3 dias após indução da mucosite por 5-FU, tratados ou não com *S. boulardii*. Observa-se que no jejuno os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduziram o aumento da imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). O mesmo observa-se no íleo, que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G).

A percentagem da área imunomarcada mostra o aumento da imunomarcção dos segmentos de jejuno ($12,9 \pm 1,4\%$) e íleo ($12,6 \pm 0,5\%$) para os animais que receberam somente 5-FU em relação ao grupo controle, jejuno ($2,1 \pm 0,2\%$) e íleo ($3,7 \pm 0,5\%$), respetivamente. E nos animais tratados com 5-FU+SB observou-se a redução da imunomarcção para iNOS tanto no jejuno (5-FU+SB: $2,8 \pm 0,3\%$), como no íleo (5-FU+SB: $5,8 \pm 0,8\%$), quando comparados aos animais que receberam somente 5-FU.



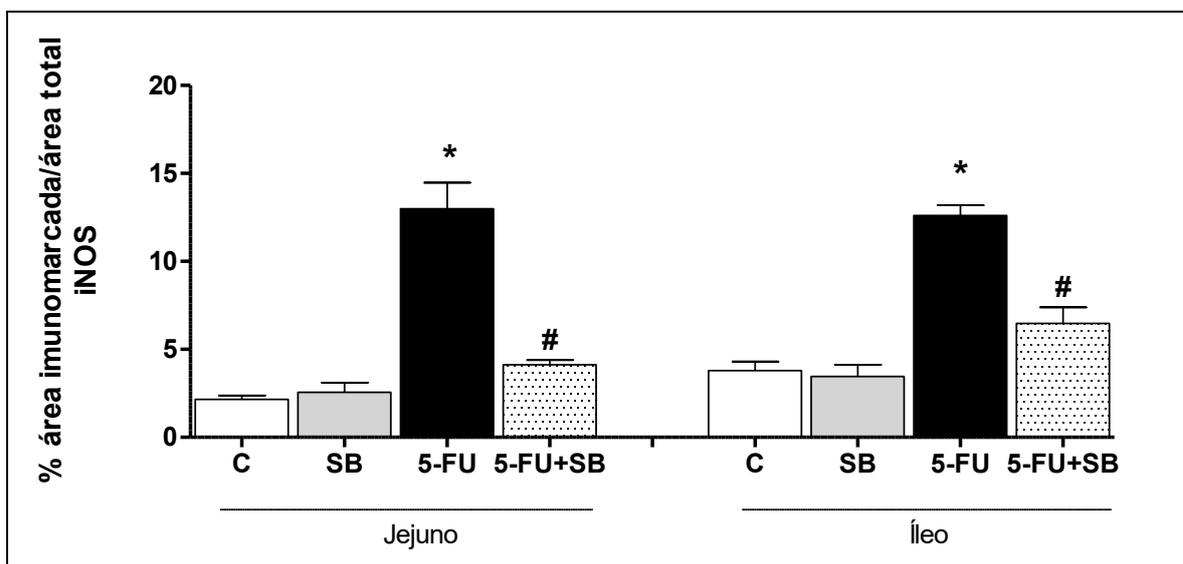


FIGURA 26: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de iNOS nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do Íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada para iNOS. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

Correlacionado com esses resultados acima, analisou-se também a expressão do mRNA para iNOS nas células Caco2 incubadas com 5-FU e/ou SB. E, observou-se que a nível celular também ocorre um aumento significativo da expressão de mRNA para iNOS nas células incubadas somente com 5-FU, um aumento de 7 x ($7,98 \pm 0,98$ U) quando comparadas com o grupo celular controle (1 x), e o grupo celular incubado com 5-FU+SB, ocorre uma redução de 4,26 x ($1,87 \pm 0,41$ U) dessa expressão quando comparados ao grupo incubado somente com 5-FU, como mostra a figura 27.

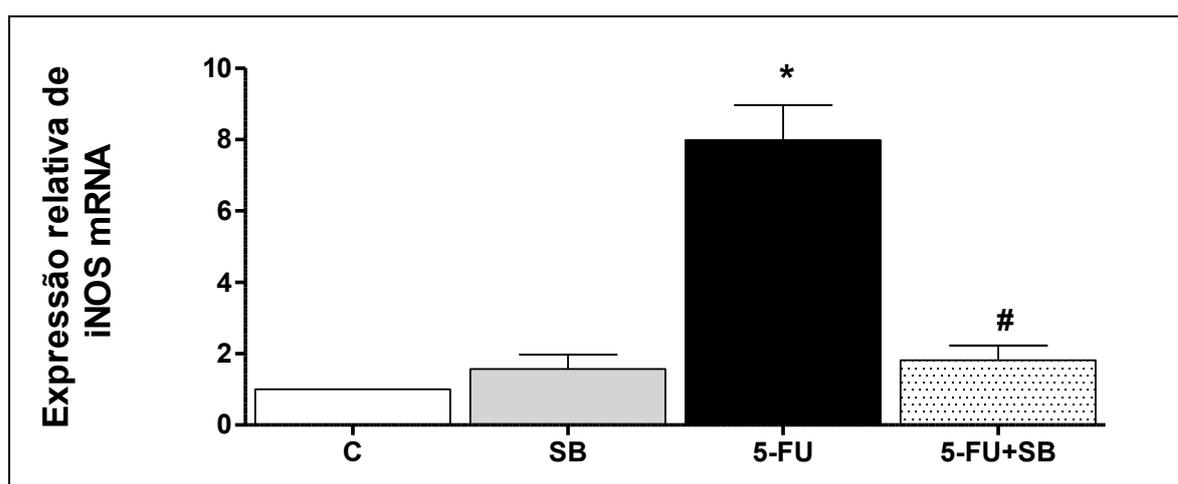
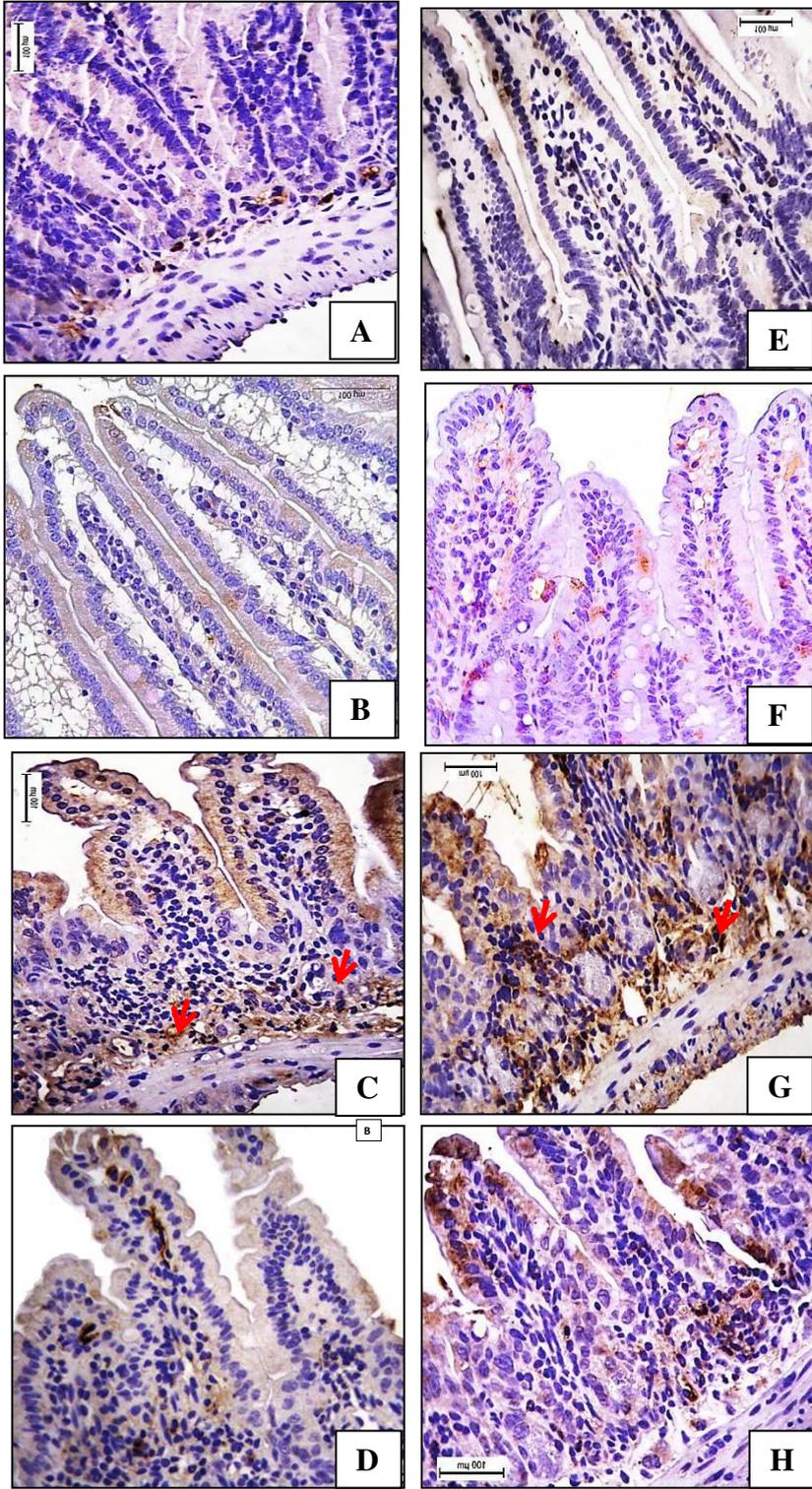


FIGURA 27: Efeito do *Saccharomyces boulardii* nos níveis de mRNA para iNOS, em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. (n = 3). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

5.3. EFEITO DO *Saccharomyces boulardii* NA AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA ADAPTADORA MyD88 E DAS PROTEÍNAS MAP quinases (phospho ERK1/2, phospho P38, phospho JNK) NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS E, EM CÉLULAS CACO2 INCUBADAS COM 5-FLUOROURACIL.

Foi realizado o ensaio de imunohistoquímica para MyD88 (Figura 28) dos segmentos de jejuno e íleo dos animais 3 dias após indução da mucosite por 5-FU, tratados ou não com *S. boulardii*. A figura 28 mostra que houve aumento na imunomarcção dos segmentos de jejuno e íleo dos animais tratados com 5-FU (C e G) em relação ao jejuno e íleo do grupo controle (A e E), respectivamente. E nos animais tratados com 5-FU+SB (D e H) houve uma redução desse parâmetro quando comparados ao grupo tratado somente com 5-FU (C e G). O grupo tratado com SB (B e F) não se observou alteração em relação ao grupo controle.

Observou-se em nossa análise da quantificação da área imunomarcada para MyD88 que houve aumento da imunomarcção no segmento de jejuno ($17,28 \pm 3,54$ %) e íleo ($16,04 \pm 0,88$ %) do grupo tratado somente com 5-FU, comparados ao grupo controle jejuno e íleo ($6,83 \pm 1,40$ e $3,85 \pm 0,27$ %), respectivamente (Figura 28). E, nos animais tratados com 5-FU+SB houve uma redução importante (jejuno: $9,52 \pm 1,71$ %; íleo: $9,70 \pm 0,60$ %) quando comparados ao grupo 5-FU.



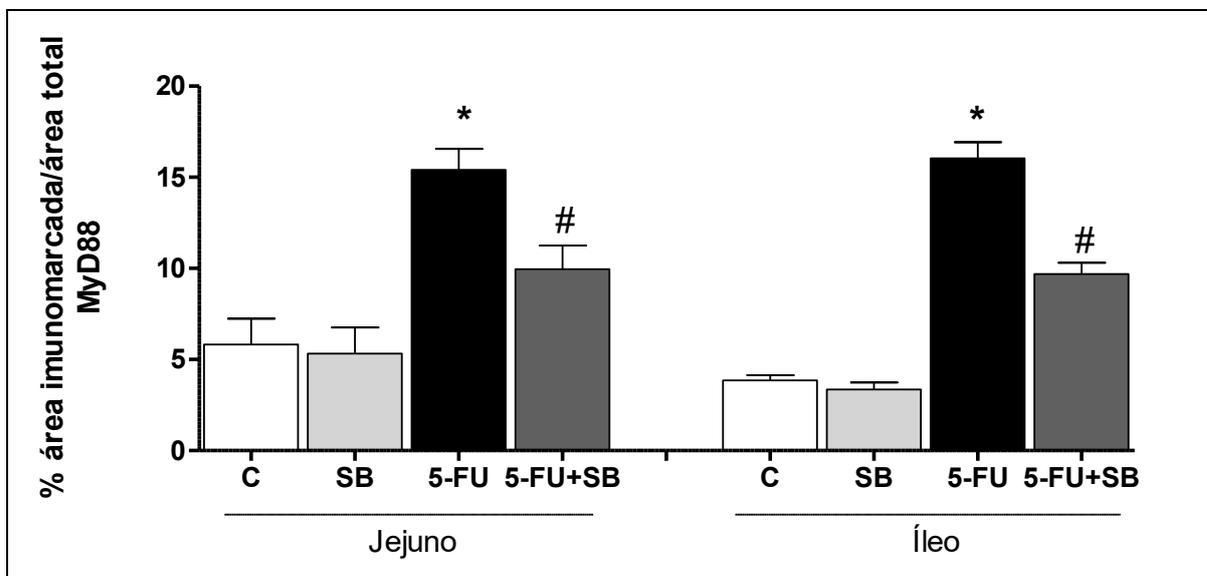
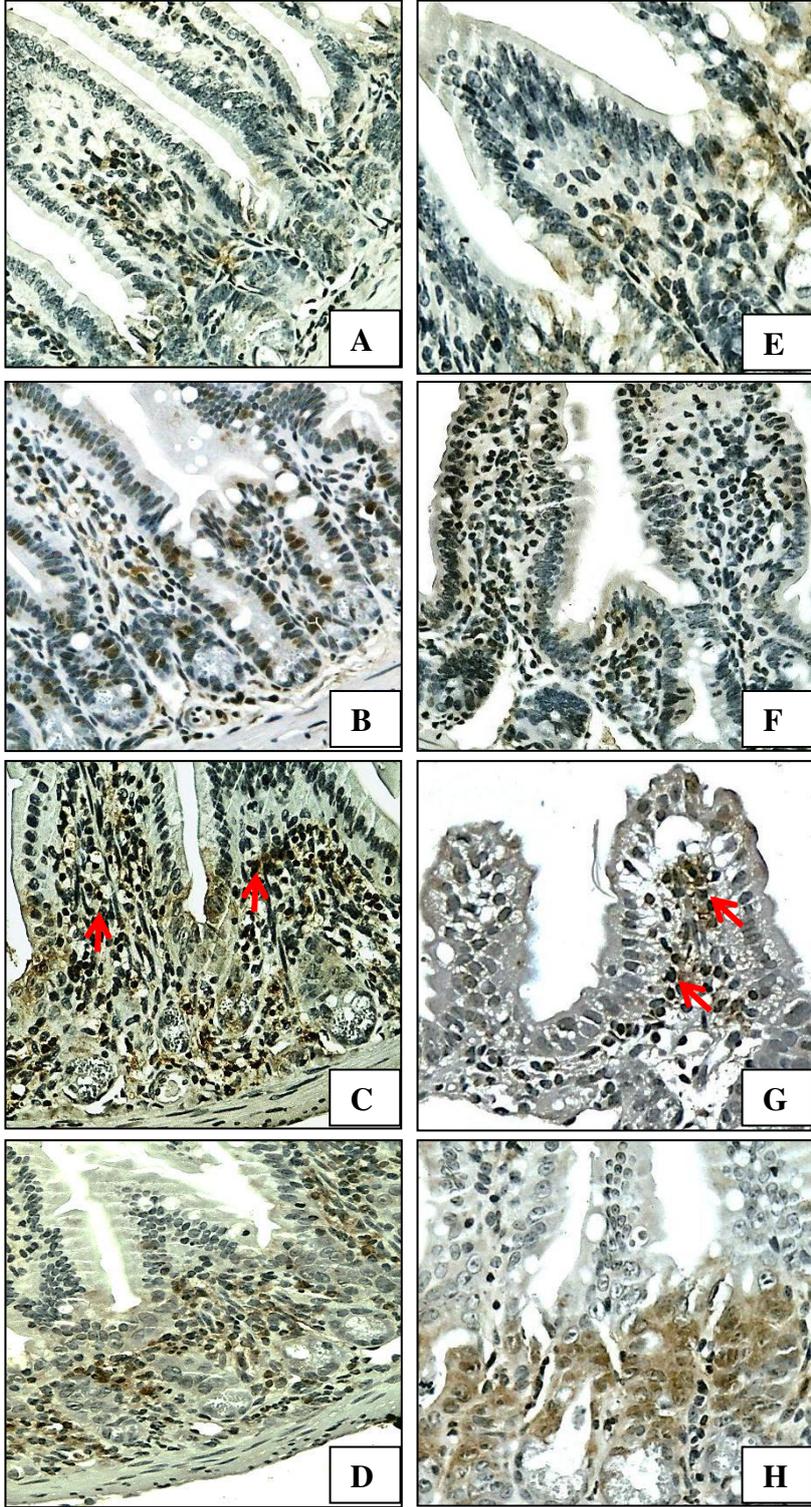


FIGURA 28: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de MyD88 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do Íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada para MyD88. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*

Através da proteína adaptadora MyD88 pode ocorrer a ativação da via MAPK e assim aumentar a produção de NF-kB e a produção de citocinas pro-inflamatórias, aumentando assim o processo inflamatório.

Para analisarmos a via MAPK (phospho-P38, phospho-ERK 1/2, phospho-JNK), utilizou-se a técnica de imunomarcação para os tecidos dos segmentos do jejuno e íleo, extraídos de animais tratados com 5-FU e/ou SB, como já descrito. E, utilizou-se também a técnica de expressão de proteínas por eletroforese em gel, western blotting (WB) para as proteínas extraídas das culturas celulares Caco2 incubadas com 5-FU e/ou SB (como já descrito).

No ensaio de imunohistoquímica para phospho-ERK1/2 (Figura 29), observa-se que ocorre uma maior expressão da imunomarcação para phospho-ERK1/2 no grupo de animais tratados somente com 5-FU (C e G) tanto no jejuno ($101,6 \pm 7,7\%$) e no íleo ($122,3 \pm 26,5\%$) quando comparados ao grupo controle (A e E) (jejuno: $65,7 \pm 3,6\%$; íleo: $101,0 \pm 18,1\%$), e uma redução significativa principalmente no íleo dessa expressão quando os animais são tratados com 5-FU+SB (D e H) (no jejuno: $86,1 \pm 5,6\%$ e, no íleo: $79,1 \pm 6,4\%$), quando comparados com o grupo tratado somente com 5-FU.



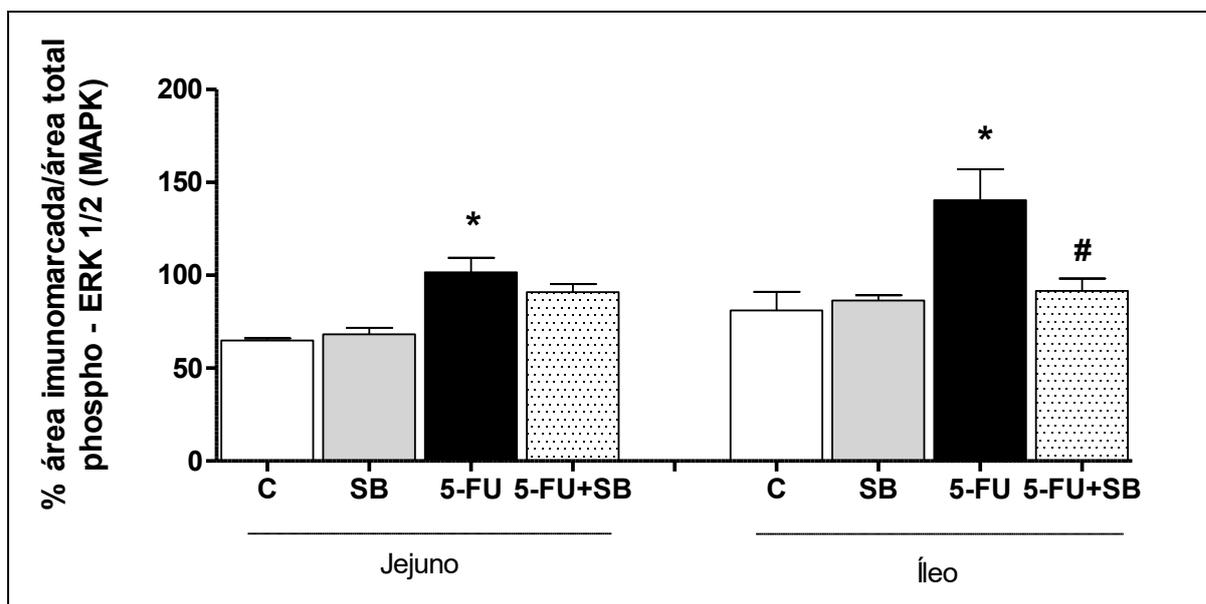


FIGURA 29: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de phospho-ERK 1/2 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada phospho-ERK 1/2. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

Corroborando com os resultados obtidos no tecido, observou-se que a nível celular (figura 30), ocorre um aumento discreto, mas importante da expressão da phospho-ERK1/2 no grupo celular incubado somente com 5-FU (14,04%) em relação ao grupo controle (100%), e uma redução dessa expressão quando as células são incubadas com 5-FU+SB (16,5%) quando comparados ao grupo incubado somente com 5-FU.

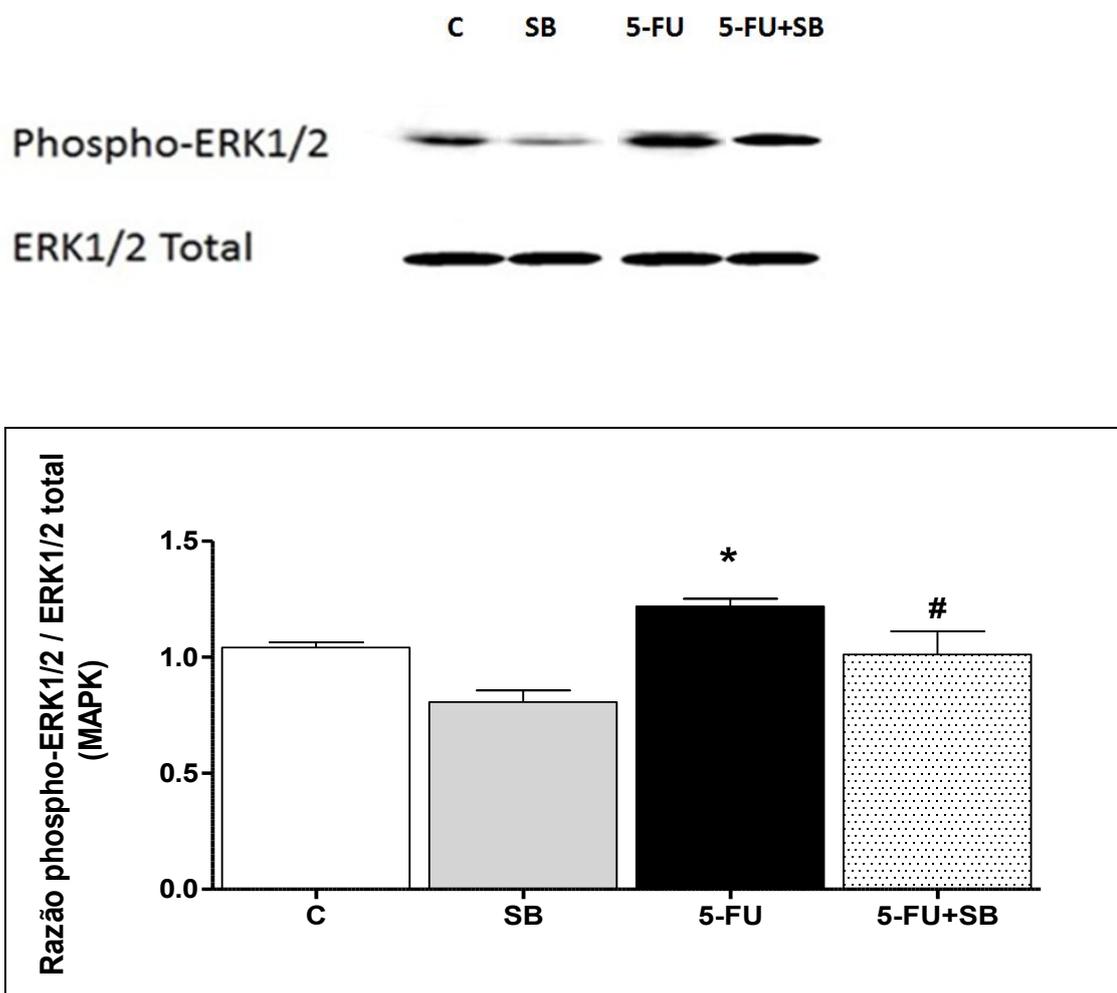
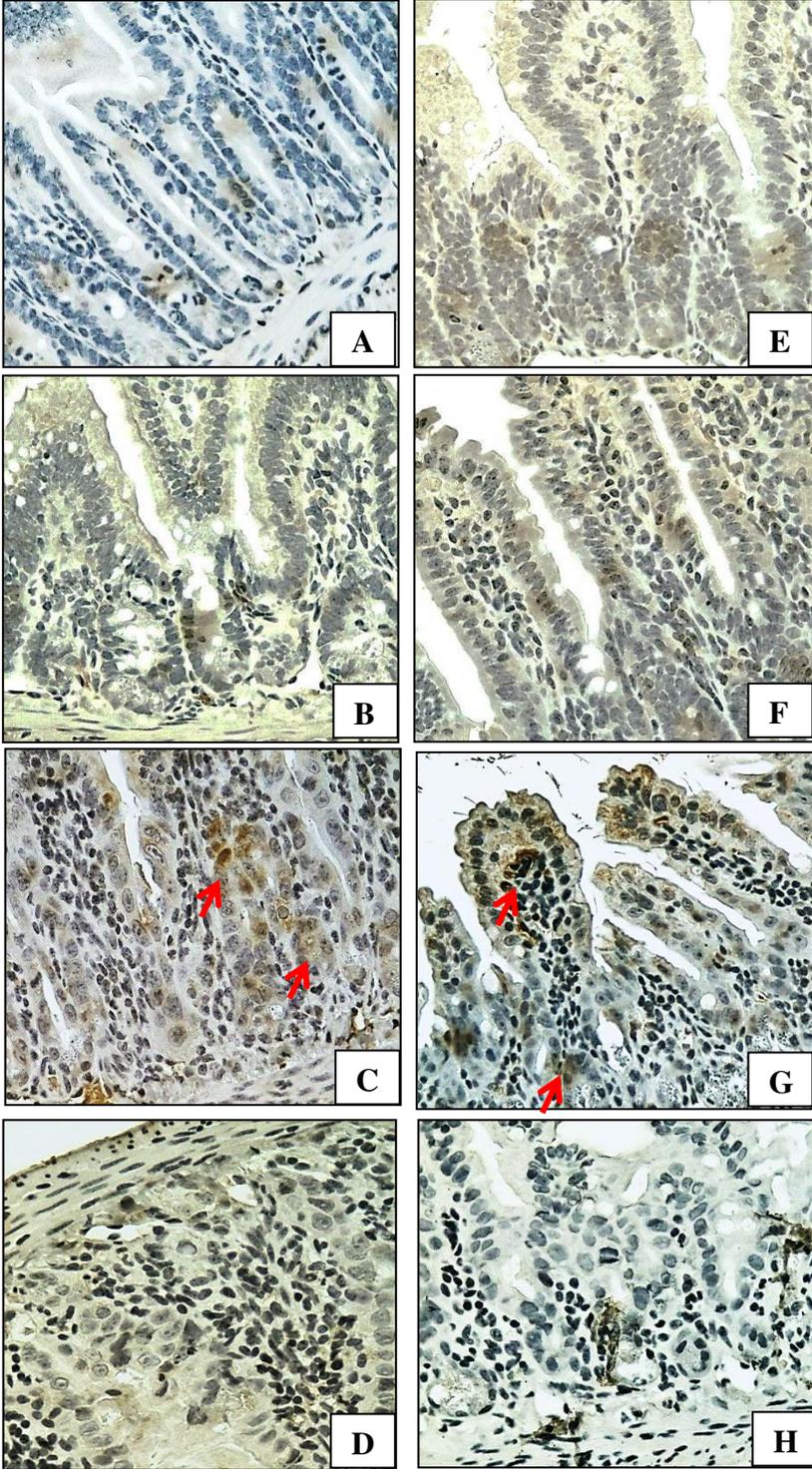


FIGURA 30: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de phospho-ERK 1/2 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. (n = 6). * P < 0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P < 0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

No ensaio de imunohistoquímica para phospho-p38 (Figura 31), observa-se que ocorre uma maior expressão da imunomarcção para phospho-p38 no grupo de animais tratados somente com 5-FU (C e G) tanto no jejuno ($54,8 \pm 2,4\%$) como no íleo ($73,4 \pm 3,0\%$) quando comparados ao grupo controle (A e E) (jejuno: $30,3 \pm 2,6\%$; íleo: $40,4 \pm 4,0\%$), e uma redução dessa expressão quando os animais são tratados com 5-FU+SB (D e H) no jejuno ($42,4 \pm 1,4\%$) e no íleo ($35,8 \pm 1,8\%$), quando comparados com o grupo tratado somente com 5-FU.



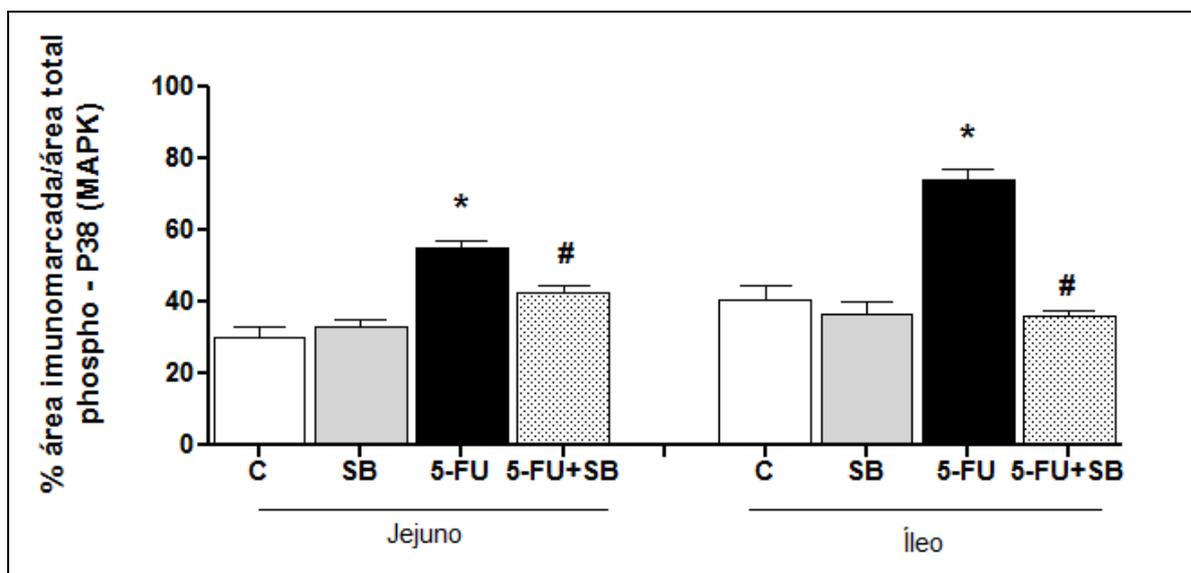


FIGURA 31: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de phospho-P38 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada phospho-p38. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

Corroborando com os resultados obtidos no tecido, observou-se que a nível celular (figura 32), ocorre uma expressão bastante significativa de phospho-p38 no grupo celular incubado somente com 5-FU, observou-se um aumento de 75,7 % quando comparado ao grupo controle (100%), e uma redução de 29,9 % dessa expressão quando as células são incubadas com 5-FU+SB comparadas com o grupo tratado somente com 5-FU.

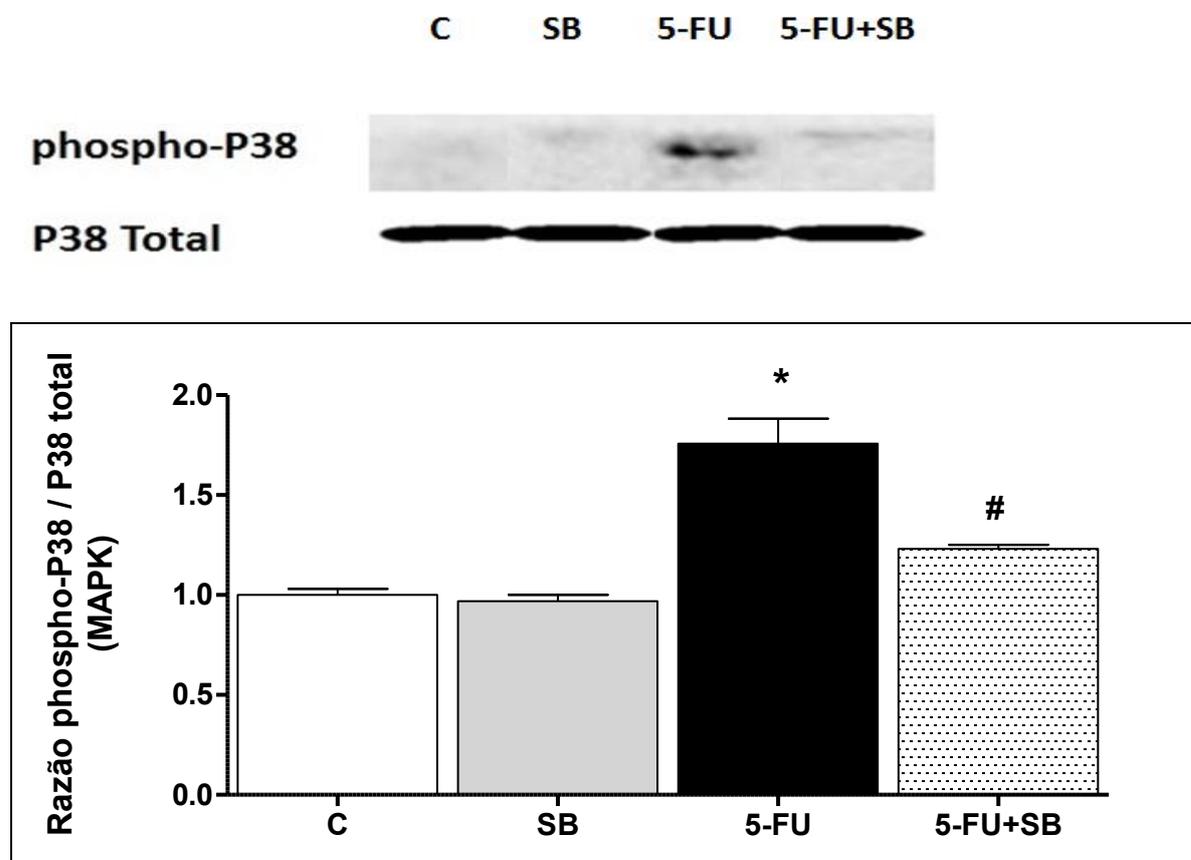
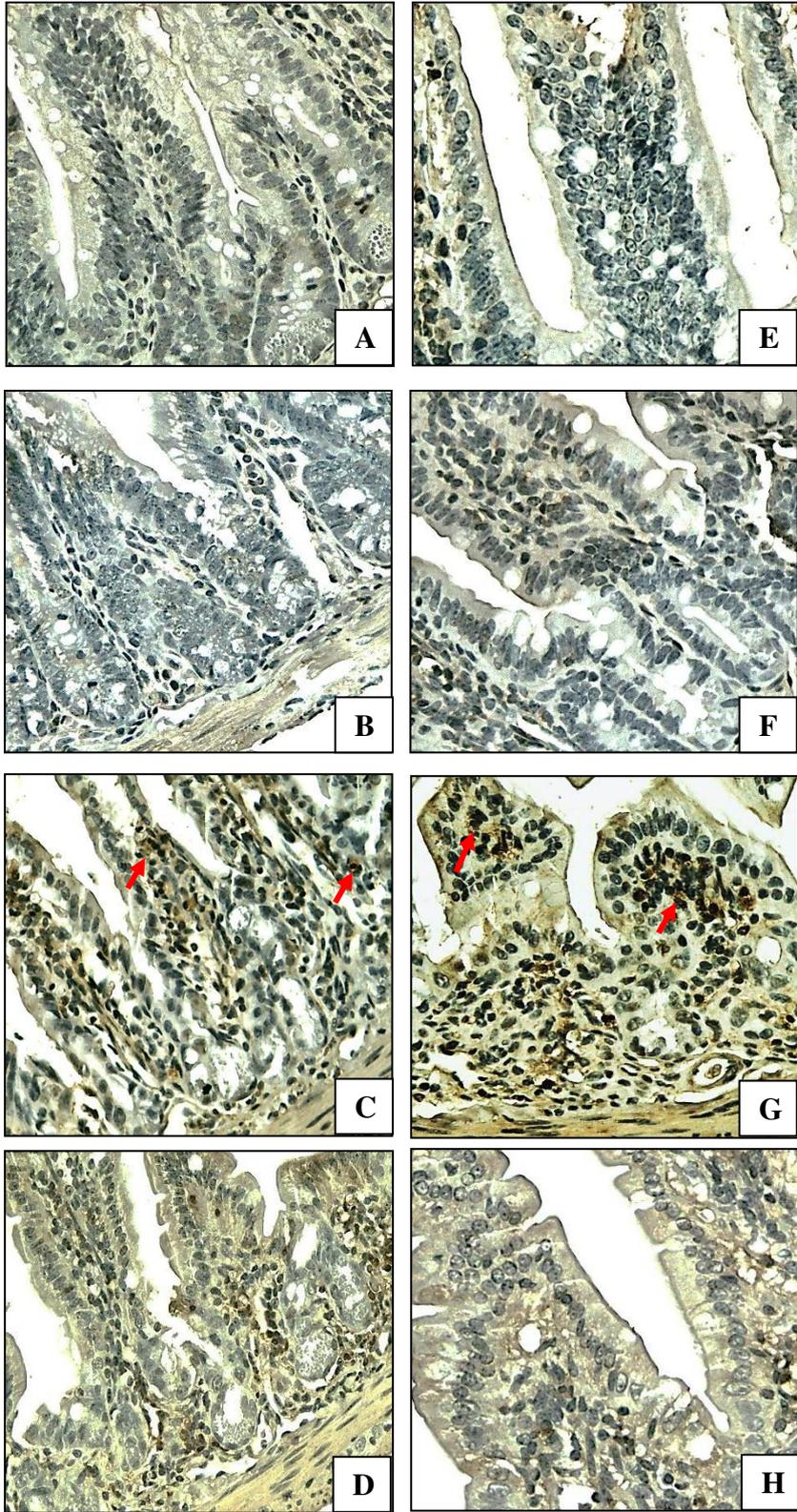


FIGURA 32: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de phospho-P38 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. (n = 6). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

No ensaio de imunohistoquímica para phospho-JNK (Figura 33), observa-se que ocorre uma maior expressão da imunomarcagem para phospho-JNK no grupo de animais tratados somente com 5-FU (C e G) tanto no jejuno ($57,87 \pm 2,4\%$) como no íleo ($58,1 \pm 3,5\%$) quando comparados ao grupo controle (A e E) (jejuno: $33,2 \pm 1,4\%$; íleo: $38,5 \pm 2,5\%$), e uma redução dessa expressão quando os animais são tratados com 5-FU+SB (D e H) no jejuno ($44,2 \pm 1,3\%$) e no íleo ($43,9 \pm 2,0\%$) quando comparados com o grupo tratado somente com 5-FU.



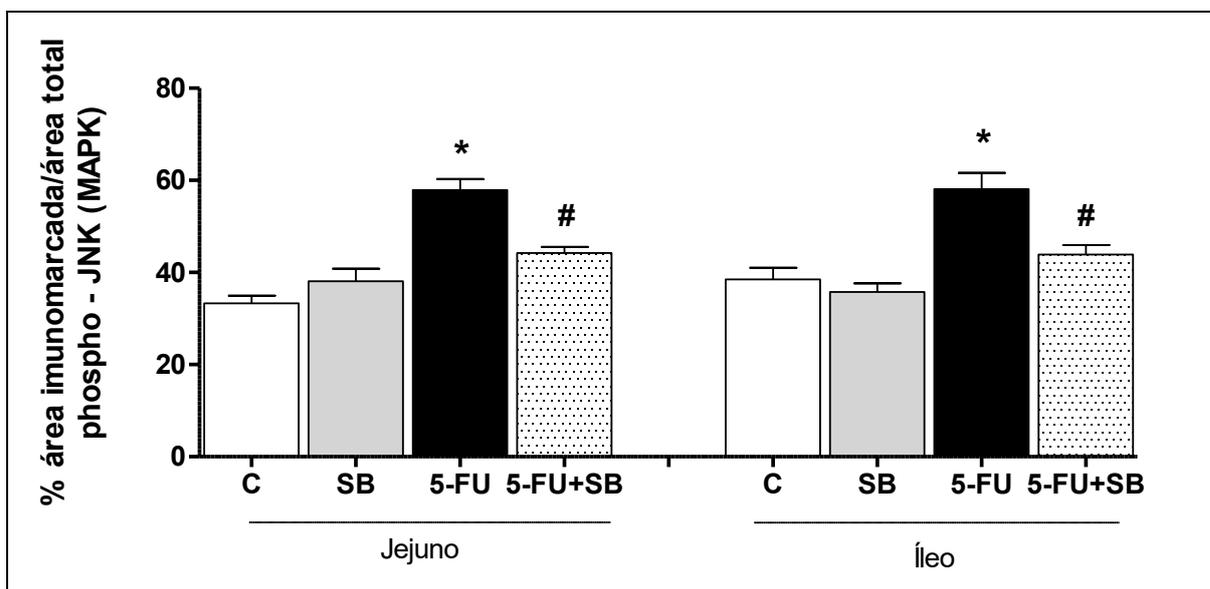


FIGURA 33: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de phospho-JNK nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcação que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcação que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada phospho-JNK. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

Corroborando com os resultados obtidos no tecido, observou-se que a nível celular (figura 34), ocorre um aumento importante de 111,8% da expressão de phospho-JNK no grupo celular incubado somente com 5-FU em relação ao grupo controle (100%), e uma redução de 44,8% dessa expressão quando as células são incubadas com 5-FU+SB e comparadas com o grupo incubado somente com 5-FU.

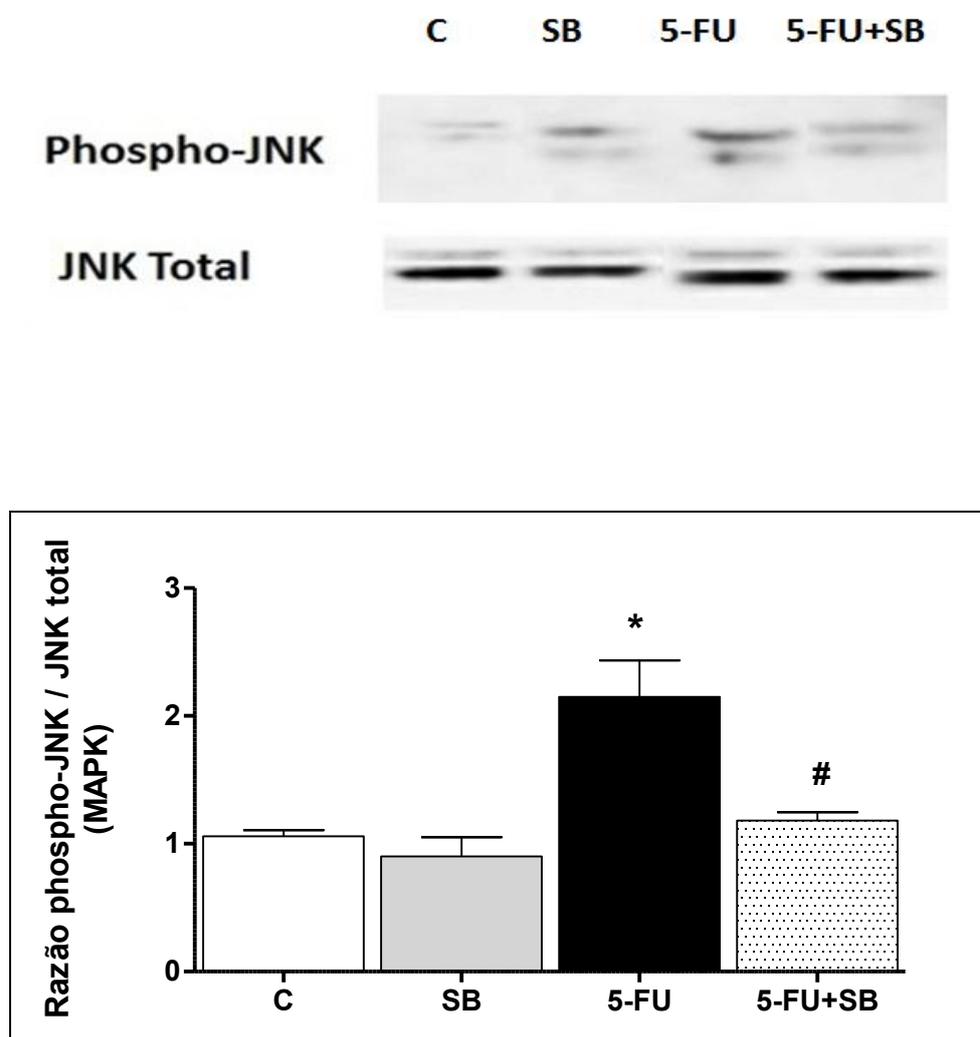
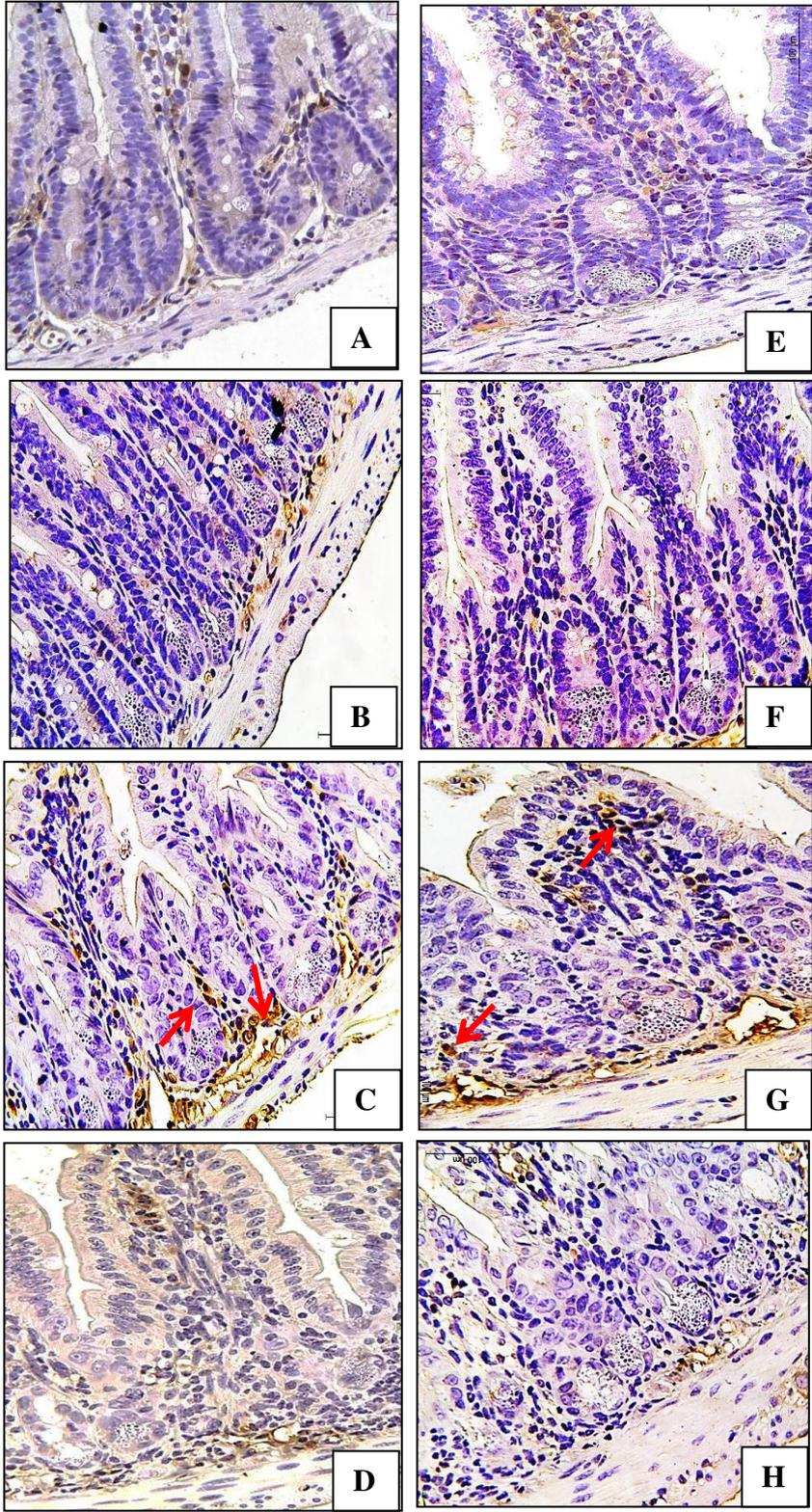


FIGURA 34: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de phospho-JNK em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. (n = 6). * P < 0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P < 0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

5.4. EFEITO DO *Saccharomyces boulardii* NA PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TOLL-LIKE (TLR2 e TLR4) NA MUCOSITE INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS E, EM CÉLULAS CACO2 INCUBADAS COM 5-FLUOROURACIL.

Para o ensaio de imunohistoquímica de TLR2 (Figura 35) dos segmentos de jejuno e íleo dos animais 3 dias após indução da mucosite por 5-FU, tratados ou não com *S. boulardii*. Observa-se que (C e G) mostram que houve aumento na imunomarcagem dos segmentos de jejuno e íleo dos animais tratados somente com 5-FU em relação ao controle jejuno e íleo (A e E), respectivamente. E nos animais tratados com 5-FU+SB (D e H) apresentaram uma redução da expressão desse receptor.

Observou-se em nossa análise da quantificação da área imunomarcada para TLR2 que houve um aumento da expressão no segmento do jejuno ($40,07 \pm 5,84\%$) e do íleo ($37,57 \pm 1,85\%$) do grupo 5-FU, comparados ao grupo controle, jejuno ($24,70 \pm 1,42\%$) e íleo ($23,97 \pm 1,13\%$), respectivamente. E, nos animais tratados com 5-FU+SB houve uma redução, jejuno ($31,90 \pm 1,62\%$) e no íleo ($20,46 \pm 3,26\%$), quando comparados ao grupo tratado somente com 5-FU.



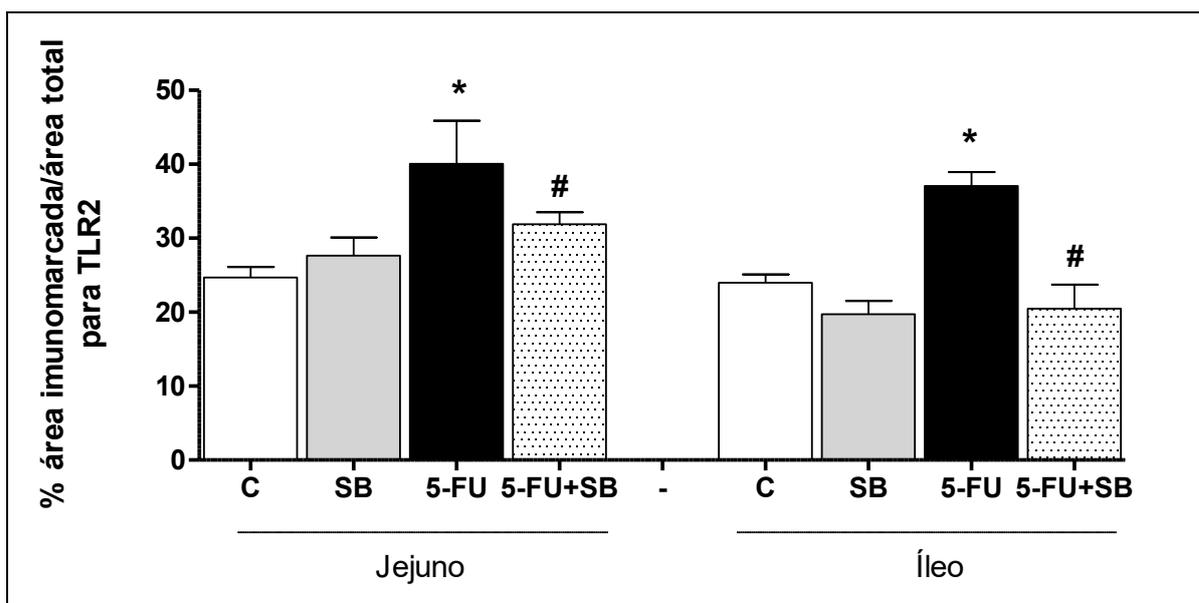
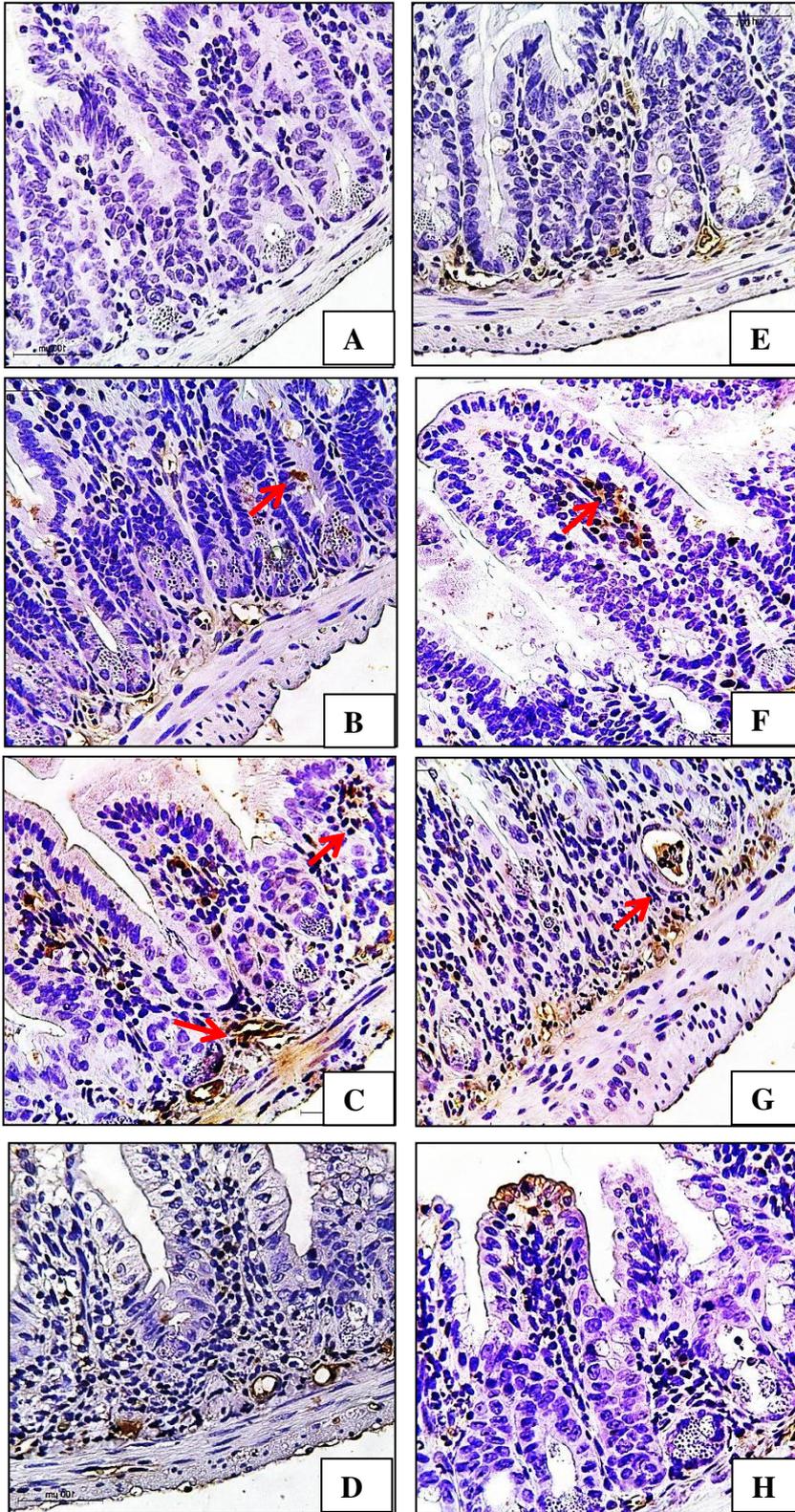


FIGURA 35: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de TLR2 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcagem que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcagem que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada TLR2. * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

Para os receptores Toll-like (TLR4), na figura 36 (C e G) mostra que houve aumento na imunomarcção dos segmentos de jejuno e íleo, respectivamente, no grupo tratado somente com 5-FU em relação ao grupo controle jejuno e íleo (A e E), respectivamente. E nos animais tratados com 5-FU+SB (D e H) apresentaram uma redução da expressão desse receptor quando comparados ao grupo que recebeu somente 5-FU.

Observou-se em nossa análise da quantificação da área imunomarcada para TLR4 que houve aumento da expressão no segmento do jejuno ($44,74 \pm 5,46\%$) e do íleo ($40,09 \pm 5,85\%$) do grupo 5-FU, comparados ao grupo controle, jejuno e íleo ($10,77 \pm 3,79$ e $18,24 \pm 2,06\%$), respectivamente. E, nos animais tratados com 5-FU+SB houve uma redução da expressão desses receptores de forma significativa tanto no jejuno ($22,60 \pm 2,04$) como no íleo ($17,47 \pm 3,58$), quando comparado ao grupo 5-FU (Figura 36).



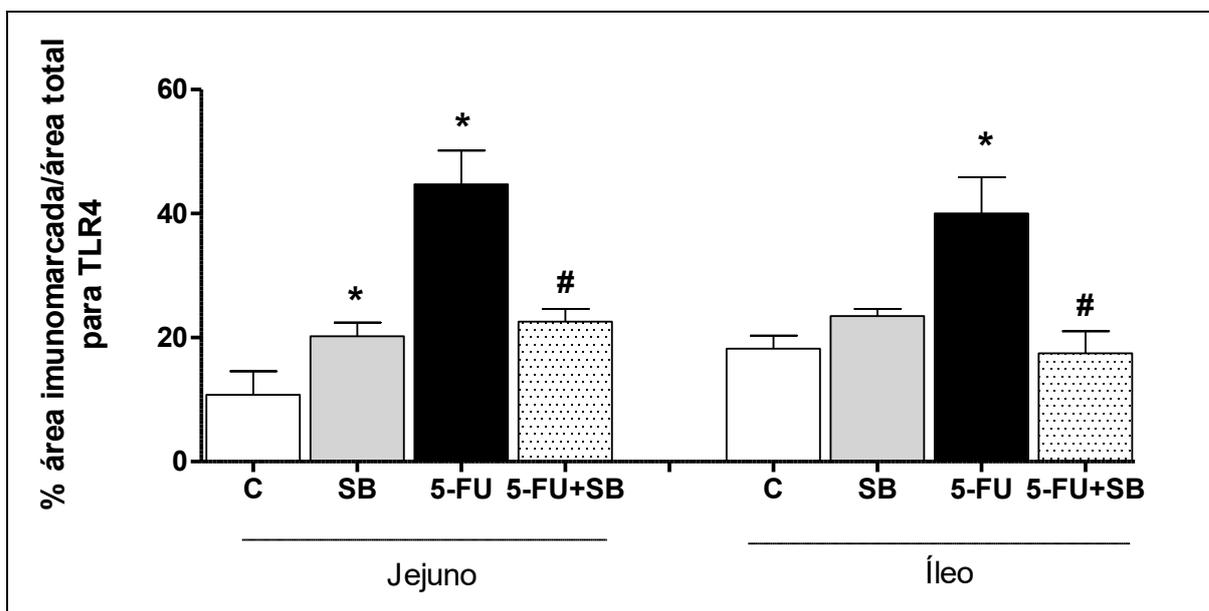


FIGURA 36: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de TLR4 nos segmentos do jejuno e íleo de camundongos após administração de 5-Fluorouracil. (A, B, C, D) - Fotomicrografias do Jejuno de camundongos tratados com salina (A), SB (B), 5-FU + salina (C), 5-FU + SB (D). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (D) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (C). (E, F, G, H) - Fotomicrografias do íleo de camundongos tratados com salina (E), SB (F), 5-FU + salina (G), 5-FU + SB (H). Observa-se que os tratamentos com 5-FU+SB (H) reduzem a imunomarcção que ocorre no grupo tratado com 5-FU+ salina (G). Quantificação da área imunomarcada TLR2. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (salina). # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*.

Para verificarmos se o 5-FU realmente induz um aumento da expressão de receptores Toll-like, como mostrado anteriormente, fizemos uma análise em células Caco2 para a expressão de mRNA para TLR2 e TLR4 e, utilizamos o lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) como controle positivo para aumento da expressão de receptores Toll-like.

A figura 37 mostra a expressão relativa de mRNA para TLR2, onde observa-se que o SB sozinho foi capaz de aumentar (49,7 x) a expressão de TLR2 em relação ao grupo controle (1x). O grupo 5-FU (101%) assim como o grupo LPS (151%) incubados sozinhos também alteram de forma significativa essa expressão do TLR2 quando comparados ao grupo controle (100%). O tratamento com SB reduz essa alteração de forma significativa, tanto para 5-FU+SB (reduz 51,61% comparado ao 5-FU), como 5-FU+SB+LPS (reduz 53,7% quando comparado ao 5-FU+LPS).

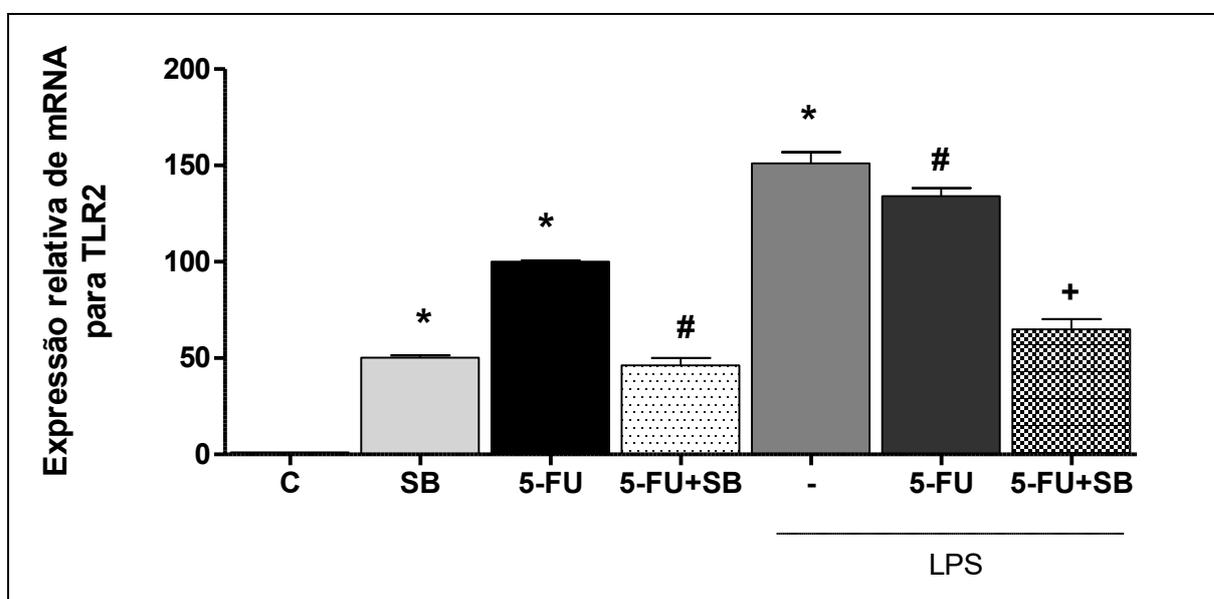


FIGURA 37: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de mRNA para TLR2 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil na presença ou não de LPS. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. (n = 4). * p <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # p <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. + p <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU+LPS. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*, LPS: Lipopolissacarídeo *E. coli*.

A figura 38 mostra a expressão relativa de mRNA para TLR4, observa-se que o SB sozinho, também, foi capaz de aumentar (46,3 x) a expressão de TLR4 quando comparado ao grupo controle. E, o grupo 5-FU (99,3 x) assim como o grupo LPS (261,1 x) incubados sozinhos também alteram de forma significativa essa expressão de TLR4 quando comparados ao grupo controle (1x). E, o SB reduz essa alteração de forma significativa, tanto para 5-FU+SB (reduz 51,2% comparado ao 5-FU), como 5-FU+SB+LPS (reduz 63,7% quando comparado ao 5-FU+LPS).

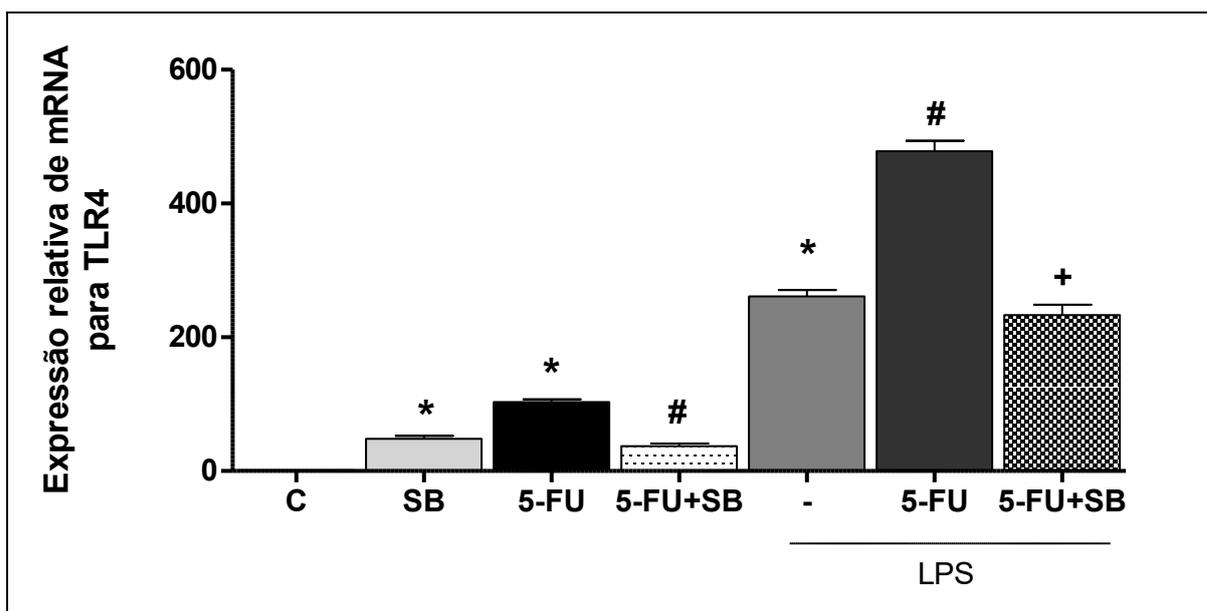


FIGURA 38: Efeito do *Saccharomyces boulardii* na expressão de mRNA para TLR4 em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil na presença ou não de LPS. Dados apresentam as médias \pm E.P.M. (n = 4). * P <0,05 quando comparado ao grupo controle (salina). # P <0,05 quando comparado ao grupo 5-FU. ANOVA e teste de Bonferroni. 5-FU: 5- Fluorouracil, SB: *Saccharomyces boulardii*, LPS: Lipopolissacarídeo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento com o *Saccharomyces boulardii* foi capaz de reverter de forma significativa as alterações causadas pelo 5-FU, o qual, resultou na indução de uma lesão intestinal apresentando um importante comprometimento da barreira epitelial funcional com a presença das seguintes alterações: encurtamento acentuado das vilosidades intestinais, necrose parcial das criptas, achatamento e vacuolização de enterócitos, com importante redução da relação vilo/cripta, presença de infiltrado mono e polimorfonucleares, leucopenia, causando também a diarreia, e alterações da expressão de NF-kB e IκB, e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , CXCL1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12).

Já com o intuito de se estudar o efeito do SB na mucosite intestinal provocada pelo 5-FU, Justino (2014) e colaboradores do nosso grupo mostraram que o 5-FU alterou a histologia e morfometria intestinal, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , CXCL-1), aumentando o consumo de GSH, ou seja, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio, assim como a produção de óxido nítrico. E, todas essas alterações foram revertidas pelo tratamento com *Saccharomyces boulardii*. Os dados do presente trabalho corroboram com tais achados.

Conforme a literatura sabe-se que a mucosite oral induzida por antineoplásicos provoca a destruição das células epiteliais e subsequente indução de resposta inflamatória local (SONIS *et al.* 2004; RUBEINSTEIN *et al.* 2004). Podemos hipotetizar que o mesmo ocorre na mucosite intestinal. Onde, observa-se também a diarreia como uma das manifestações mais comuns da mucosite intestinal relacionada à quimioterapia do câncer (ARNOLD *et al.* 2005).

Em nossa pesquisa observou-se que a presença de diarreia nos animais tratados com 5-FU, no último dia experimental, não foi tão intensa como a diarreia causada por outros agentes antineoplásicos, como o irinotecano (GIBSON *et al.* 2007; LOGAN *et al.* 2008; STRINGER *et al.* 2009), outro estudo de Kang *et al.* (2013), mostraram que a diarreia foi observada somente no dia 5 após a administração de 5-FU. Indicando que a administração de 5-FU afeta o peso corporal dos animais possivelmente devido à ativação de respostas inflamatórias seguido pelo mau funcionamento gastrointestinal. Logo a presença de diarreia nos animais tratados com 5-FU somada às alterações da mucosa intestinal, como a necrose e perda na altura dos vilos e alteração da profundidade das criptas, por exemplo, justificam a menor capacidade de absorção do intestino, levando os animais a um quadro de desnutrição,

com uma perda de peso significativa (JUSTINO *et al.* 2014) e, de acordo com a nossa hipótese, essas alterações estão relacionadas com o processo inflamatório e a disfunção intestinal.

Os neutrófilos tem uma importante participação no mecanismo de mucosite intestinal (RIBEIRO *et al.* 2002), e a dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase, tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrintestinal. Nós destacamos a importante participação dos neutrófilos onde foi observado um aumento importante da atividade da enzima mieloperoxidase. A liberação da enzima mieloperoxidase dos grânulos azurófilos catalisa a formação de um poderoso ácido oxidante, o ácido hipocloroso, o que pode levar a danos no DNA, proteínas e lipídeos. Além disso, a mieloperoxidase pode agir no endotélio vascular promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e expressão de moléculas de adesão, levando ao aumento da permeabilidade vascular e aumento da adesão de neutrófilos. Após desgranulação, o neutrófilo também libera várias substâncias como proteínas antimicrobianas, proteases, componentes da resposta oxidativa, vários receptores de membrana para moléculas de adesão endotelial, metaloproteinases de matriz (*“Matrix Metalloproteinases”* - MMPs) e mediadores solúveis da inflamação (FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003).

Nossos dados estão de acordo com a literatura, que demonstra que a injúria epitelial associada à utilização de quimioterápicos antineoplásicos, geralmente, ocorre com infiltração de neutrófilos para a mucosa intestinal que configura a fase inflamatória da mucosite (SONIS *et al.* 2004) também descrita por Duncan e Grant (2003). Outros achados da literatura revelam os neutrófilos como componentes centrais da resposta inflamatória, fato relevante para os mecanismos de fagocitose, produção de radicais livres e bem como para produção e ativação de mediadores inflamatórios (REAVES; CHIN; PARKOS, 2005). E, nós mostramos que o uso do probiótico SB é capaz de reverter de forma significativa essa intensa migração de neutrófilos.

Outros estudos, como o de Sezer *et al.* (2008) demonstraram a ação do SB melhorando a mucosite intestinal. Eles mostraram que na mucosite intestinal induzida por irinotecano observa-se uma migração de leucócitos e uma inflamação da mucosa intestinal significativamente menores nos animais que receberam o tratamento com SB. Esses autores demonstraram também que a espessura das vilosidades intestinais nos animais tratados com irinotecano é significativamente menor em relação a dos animais que receberam irinotecano +

SB, mostrando que o SB tem um efeito protetor proeminente sobre a lesão na mucosa intestinal. Dados esses que corroboram com os nossos achados de reversão, pelo SB, dos aspectos gerais da inflamação na mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Como encontramos em nossa pesquisa, outros autores já mostraram que o SB é capaz de atenuar sinais de inflamação como hiperplasia das criptas intestinais, os escores de danos histológicos e reduzir a atividade de mieloperoxidase, em modelos animais de colite induzida por *Citrobacter rodentium* (Wu *et al.* 2007).

A migração dos enterócitos para reparar o epitélio danificado é considerada uma importante etapa na resolução do processo inflamatório. Na tentativa de explicar porque o SB é eficiente em atenuar a resposta inflamatória, Canonici *et al.* (2011), demonstraram que o SB secreta compostos que aumentam a migração dos enterócitos, independentemente da proliferação celular. Esta migração avançada foi associada com a capacidade do SB de favorecer a interação de células da matriz extracelular. Estes autores concluíram que o SB secreta fatores mitogênicos que aumentam a restituição celular através da regulação dinâmica da atividade da integrina $\alpha_2\beta_1$, *in vitro* e em animais C57BL.

Considerando que os mecanismos associados à proteção intestinal induzidos pelo *Saccharomyces boulardii* durante a mucosite intestinal causada pelo 5-FU não estão completamente compreendidos, optou-se por avaliar o efeito do SB em duas vias celulares bastante importantes no processo inflamatório, as vias NF-kB e MAP quinase, assim como avaliar também a expressão de citocinas pro-inflamatórias.

Os dados do presente trabalho evidenciaram uma redução, pelo uso do SB, da expressão do fator de necrose kB (NF-kB), assim como o aumento da expressão de I κ B, seu inibidor fisiológico, e uma redução, bastante significativa, da expressão de citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , CXCL1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12 e IFN- γ , após a indução da mucosite pelo 5-FU e em ensaios com cultura de células Caco-2 *in vitro*, após indução pelo 5-FU. Assim, duas possibilidades foram postuladas na tentativa de estabelecer o mecanismo de ação do SB: 1) que ele age inibindo a via NF-kB diminuindo assim o processo inflamatório, agindo diretamente sobre o I κ B, aumentando a sua expressão e inibindo a produção de NF-kB. 2) que ele age inibindo a via MAP quinase, por inibir indiretamente a transcrição de NF-kB e de outras citocinas inflamatórias pela inibição da fosforilação de proteínas como ERK1/2, p38 e JNK.

O papel da via NF-kB na mucosite induzida por 5-FU já foi estabelecido no trabalho de Chang *et al.* (2012), onde eles mostraram um aumento da expressão da proteína NF-kB na mucosa do intestino delgado em animais tratados com 5-FU em comparação com o grupo de controle. Nós encontramos resultados convergentes no nosso trabalho, sendo o SB capaz de atenuar a expressão desse mediador.

Outras investigações mostraram que o SB produz um fator anti-inflamatório solúvel (SAIF), que inibe a ativação do NF-kB e atenua a sinalização pró-inflamatória em células hospedeiras (SOUGIOULTZIS S *et al.* 2006. DAHAN S *et al.* 2003). Sougioultzis *et al.* (2006) mostrou que em colonócitos humanos HT-29 e em monócitos THP-1 estimulados com IL-1 β , TNF- α ou LPS na presença ou ausência do sobrenadante da cultura de Sb (SBS), o SBS inibiu a produção de IL-8, impedido a degradação de I κ B- α , e reduziu tanto a ligação como o gene de NF κ B. Concluíram que o SB exerce um efeito anti-inflamatório através da produção de um fator solúvel de baixo peso molecular que bloqueia a ativação de NF-kB e a expressão do gene de NF-kB em células epiteliais intestinais e em monócitos. Logo, o SAIF podem mediar, pelo menos em parte, os efeitos benéficos do SB na doença humana intestinal, infecciosa e não infecciosa.

Alguns estudos demonstraram que as citocinas regulam e ampliam a resposta imune, induzem lesão tecidual e mediam complicações, como a diarreia (SARTOR, 1994). Williams (2001) relatou que citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-2 contribuem com a gravidade e manutenção de lesões na mucosa intestinal. De Koning *et al.* (2006) demonstraram que a resposta imune da mucosa tem um papel importante durante a mucosite induzida por metotrexato. TNF- α e IL-10 contribuem para regular o dano da mucosa através da restrição excessiva da mucosite. Sabe-se também que a IL-1 α , IL-1 β e TNF- α estimulam a secreção de outras citocinas, outros metabólitos do ácido araquidônico e proteases por macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas e células epiteliais (SARTOR, 1994).

Assim como encontramos em nosso trabalho, outros autores mostraram que o 5-FU altera as expressões de citocinas pró-inflamatórias durante todo o desenvolvimento da mucosite (CURRA *et al.* 2013; WATANABE *et al.* 2013; JUSTINO *et al.* 2014; JUSTINO *et al.* 2015). Soares *et al.* (2013), observou que o 5-FU induziu mucosite intestinal com um aumento concomitante na concentração de IL-4. De acordo com Fang *et al.* (2014), em estudos com células Caco2, eles demonstraram que a expressão do gene TNF- α , MCP-1, e IL-12 exibiu uma hiperregulação nas células Caco2 incubadas com 5-FU durante as primeiras 24 h. Dados esses também mostrados por nós nesse estudo.

A literatura tem mostrado que outras drogas utilizadas na quimioterapia do câncer também podem levar a uma mucosite intestinal com a participação de citocinas. Melo *et al.* (2008) demonstrou que o irinotecano (CPT-11), importante quimioterápico bastante utilizado na clínica, causa significativo dano à mucosa intestinal, induzindo um aumento significativo na concentração de TNF- α , IL-1 β e CXCL1 no intestino de camundongos. Outros trabalhos observaram que a radioterapia também é capaz de induzir aumento dos níveis de TNF- α e IL-1 β em modelos animais de mucosite oral (SONIS *et al.* 2000). Essas evidências mostram a importância das citocinas no desenvolvimento da mucosite gastrointestinal induzida pelo tratamento anticâncer.

O SB mostra, em vários estudos, reduzir a resposta inflamatória intestinal, através da diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (FIDAN *et al.* 2009; JUSTINO *et al.* 2015). Em outras doenças como o HIV, o SB também se mostrou importante, por exemplo, Villar-García *et al.* (2015) em seus estudos concluíram que pacientes HIV infectados, após 12 semanas de tratamento com SB diminuíram a produção de IL-6, diminuindo o quadro inflamatório. Assim como Lee *et al.* (2008) em seu estudo usando o modelo químico de colite induzida por TNBS, descobriram que a administração do SB reduz todos os aspectos da colite, incluindo danos histológicos, diarreia, e os níveis dos mediadores pró-inflamatórios das mucosas (IL-1 β , IL-6, TNF- α , e iNOS).

Nesse estudo, nós demonstramos que o SB é capaz de atenuar o aumento da expressão de mRNA para IFN- γ causado pelo 5-FU, mas já em 2007, Jawhara e Poulain, já haviam demonstrado que o SB foi capaz de reduzir a reação inflamatória e a colonização do intestino de ratos, em um modelo de colite induzido por sódio dextrana-sulfato (DSS), que estava associado à diminuição da expressão dos níveis de mRNAs para INF γ no cólon. Outro estudo mostrou que o SB inibe a produção de IFN γ no cólon que está correlacionada com o aprisionamento de células T em nódulos linfáticos mesentéricos (DALMASSO G *et al.* 2006).

Logo, nós demonstramos que as citocinas e as vias de sinalização inflamatória são modificadas pelo tratamento com SB, e podem também reduzir a lesão intestinal, assim como Sezer *et al.* (2008) demonstrou em seu estudo de mucosite oral. Com tudo, o efeito protetor do SB, encontrado em nosso estudo, pode ser explicado por sua capacidade em inibir o aumento das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-8, CXCL1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- γ) e alterar as vias de sinalização celular.

Vale ressaltar que a produção de níveis elevados de NO está associada a efeitos inflamatórios (DIJKSTRA *et al.* 1998). A atividade da iNOS é regulada durante a ativação

imune e pode resultar na síntese de níveis elevados de NO. O efeito inibitório do SB na atividade da iNOS foi exibido em modelo de indução de diarreia pelo óleo castor (mamona/ricínio) em ratos. O nível de citrulina (um marcador de produção de NO) estava aumentado no cólon desses ratos, considerando que a administração de SB foi mostrada por bloquear esta produção. O mesmo efeito é relatado com o uso de um inibidor de iNOS. Estes resultados sugerem que a inibição da iNOS por SB pode ser benéfica no tratamento da diarreia e da inflamação associada a produção exagerada do NO (GIRARD *et al.*, 2005). Nós observamos também em estudos anteriores (JUSTINO *et al.* 2014) que o tratamento com SB foi capaz de atenuar as concentrações de nitrito que estão aumentadas com a administração do 5-FU. E, nesse estudo, nós observamos que o SB mais uma vez foi capaz de atenuar o aumento da expressão de iNOS causado pelo 5-FU, tanto nos tecidos de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU, como em células Caco2 incubadas com 5-FU.

Com o intuito de avaliar a segunda possibilidade na tentativa de estabelecer o mecanismo de ação do SB, realizou-se a técnica de eletroforese em gel para as proteínas fosforiladas (ERK1/2, p38 e JNK). E, os resultados do presente trabalho, evidenciaram que as MAP quinases são alteradas pela indução da mucosite pelo 5-FU, todas as MAP quinase analisadas mostraram um aumento da sua expressão quando o 5-FU era administrado, mas observamos que o tratamento com SB foi capaz de atenuar esse aumento na expressão dessas MAP quinases, mostrando que o SB pode agir inibindo a fosforilação de ERK1/2, p38 e JNK, diminuindo assim o processo inflamatório por inibir a transcrição do NF- κ B e de citocinas pro-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , CXCL1, IL-8, IL-4, IL-6, IL-12 e IFN- γ .

Na literatura já haviam estudos que demonstravam que o 5-FU interfere na via MAP quinase, Yang *et al.* (2010), por exemplo, mostraram que a phospho-p38 MAPK foi afetada pelo tratamento com 5-FU em células HT29, o nível de phospho-p38 foi significativamente elevado em comparação com as células não tratadas. Sugerindo que o 5-FU aumentou significativamente a fosforilação da p38 em células HT29. Para a cascata MEK MAPK, eles verificaram que ambos os níveis de p42/44 e phospho-p42/44 não foram alterados após o tratamento, indicando que a via MEK MAPK não foi afetada pela administração do 5-FU (TROPMAIR *et al.* 1994). E, Morcillo *et al.* (2012) em seu estudo também observou um aumento da expressão de phospho-p38 quando se administra 5-FU, mas eles concluíram que a phospho-p38 é a única MAPK claramente ativada pelo 5FU, e que para a expressão de phospho-ERK e phospho-JNK não existe um aumento expressivo de suas concentrações quando se é administrado 5-FU. Em contraste, Dinicola *et al.* (2013) demonstrou que a

estimulação de células Caco-2 e células HCT-8 com 5-FU por 24 h era capaz de induzir um aumento estatisticamente significativo da fosforilação de ERK1/2.

Nós demonstramos que em células Caco2 incubadas com 5-FU ocorre uma alteração da expressão de phospho-ERK1/2, phospho-p38 e phospho-JNK, e que quando essas células são co-incubadas com 5-FU e SB, *in vitro*, ocorre uma redução dessas expressões, mostrando uma possível interação do SB com a fosforilação dessas MAP quinases (ERK1/2, p38 e JNK).

Já haviam evidências de que o SB em outros modelos poderia agir pela via MAP quinase, Martins *et al.* (2010) revelou em seu estudo que o SB diminuiu a capacidade de *S. typhimurium* de invadir células T84 e evitou a secreção de IL-8, por meio da inibição da sinalização das vias MAPK. Chen *et al.* (2006), demonstraram que a presença do sobrenadante de cultura SB (SbS) reduziu significativamente a produção de IL-8 e IL -1 β e inibiu as MAP quinases ERK1/2 e JNK/SAPK mas não p38 MAPK, em células NCM460, estimuladas pela toxina A do *C. difficile*. Dahan *et al.* (2002), demonstram que o SB exerce um efeito preventivo sobre a infecção por EHEC por também diminuir a secreção de IL-8, citocina pró-inflamatória, através da inibição das vias de sinalização NF-kB e MAPK em células T84 infectadas.

No presente trabalho investigou-se o papel de receptores toll-like na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Dentre eles foram estudados os receptores toll-like do tipo 2 e 4 e a proteína adaptadora MyD88. Pois, podemos concluir que o SB foi capaz de inibir as vias NF-kB e MAPK. Como os dados celulares em Caco2 não evidenciam o mesmo ambiente *in vivo*, pois não há interação com as bactérias da microflora intestinal, por exemplo, nós utilizamos um modelo de infecção de células Caco2 com LPS (DAVOODI H. *et al* 2013). E, analisarmos como o SB agiu durante o processo infeccioso em células Caco2 incubadas com 5-FU na presença ou não de LPS. Vale ressaltar que mesmo o ambiente não sendo o mesmo, *in vivo e in vitro*, nossa hipótese é que essa via está presente nos dois modelos.

Vários receptores toll-like e receptores da família IL-1 de citocinas são conhecidos por sinalizarem através de uma rede intracelular complexa que envolve vias dependentes de MyD88 ou independente de MyD88 (COHEN *et al.* 2002) que regulam a resposta imune da mucosa (HAUSMANN *et al.* 2002; REUTER *et al.* 2004). Curiosamente, Frank *et al.* (2015) demonstraram que camundongos nocaute para TLR2 injetados com metotrexato apresentaram uma mucosite exacerbada. Além disso, Sukhotnik *et al.* (2014) sugeriram que a sinalização

dependente de MyD88 para TLR4 é um fator protetor contra a lesão intestinal induzida pelo metotrexato.

É bem sabido que a via de TLR / MyD88 induz a ativação da sinalização do fator nuclear kappa B (NF-kB). E, já existe evidência de que a expressão de NF-kB é aumentada durante a mucosite (CHANG *et al.* 2012).

Logo, uma das nossas hipóteses é que as citocinas pró-inflamatórias liberadas no processo inflamatório causado pelo 5-FU podem estar agindo via MyD88, ativando a via MAPK e a via NF-kB, levando a um aumento do processo inflamatório geral que consegue ser atenuado pelo uso do SB. Nesse trabalho observou-se que o 5-FU foi capaz de promover um aumento na expressão de MyD88 em animais tratados com 5-FU, nos segmentos do jejuno e íleo, e que o SB foi capaz de atenuar essa alteração de forma significativa, principalmente no íleo.

No estudo de Wong *et al.* (2015) eles demonstraram em amostras do intestino, que os camundongos noucautes para MyD88 exibiram uma redução da ativação de NF-kB, assim como da expressão de mediadores pró-inflamatórios. Estes resultados sugeriram claramente que a transcrição deste fator com consequente transcrição de mediadores inflamatórios está ligado a via de TLR / MyD88. Da mesma forma, foi demonstrado que a ativação de TLR2 em células microgliais BV-2 leva à indução da via de sinalização MyD88 / PI3-quinase / AKT / NF-kB, que medeia a expressão de várias citocinas, bem como de COX-2 e iNOS (LIN *et al.* 2010). Possivelmente, a notável resposta protetora mostrada com MyD88 reflete não apenas a modulação da sinalização pelos receptores toll-like, mas também uma modulação mais ampla de membros da família da IL-1.

Outros estudos também demonstraram que o TLR4 ativa a sinalização do NF-kB por meio da via de MyD88, que conduz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias bem como muitos componentes importantes da resposta inflamatória (O'Leary *et al.* 2012).

A interação de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) ou de produtos químicos com receptores toll-Like é capaz de ativar vários fatores de transcrição, particularmente NF-kB e MAP quinases, e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias (RAKOFF-NAHOUM *et al.* 2004; KAWAI & AKIRA, 2006). A desregulação da sinalização de TLRs em células epiteliais intestinais parece ser um importante fator patogênico no estabelecimento de inflamações intestinais (PODOLSKY. 2002), incluindo a mucosite.

Nós demonstramos que o 5-FU foi capaz de aumentar a expressão de TLR2 e TLR4 em segmentos intestinais (jejuno e íleo) dos animais tratados com 5-FU em relação ao grupo controle.

De acordo com LI *et al.* (2014) os TLR são como sensores de morte celular e são responsáveis pela remodelação de tecidos, podendo ter um papel universal no câncer por ativar o sistema imunitário inato. Eles constituem um elo entre imunidade inata (não específica) e adaptativa (específica), contribuindo na capacidade do nosso sistema imunitário para combater eficazmente patógenos. Eles também permitem que as células imunes possam discriminar entre o eu e o antígeno *nonself* (NIEDZIELSKA *et al.* 2009).

Já foi demonstrado em um estudo clínico, que em pacientes que utilizam 5-FU pode-se observar além da perda de peso, ulcerações gastrintestinais, grande infiltrado neutrofílico e de eosinófilos, aumento da expressão de IL-6 e TNF- α e da permeabilidade intestinal, já firmado pela literatura, observa-se também um aumento na expressão de TLR4, um aumento três vezes maior em relação ao grupo controle (FERREIRA *et al.* 2012).

Antagonistas TLR4 foram encontrados por representar um risco de comprometer a imunidade do hospedeiro em outros estudos, de modo que é um dilema científico, se um agonista ou antagonista de TLR4 deve ser alvo como tratamento para o cancer (MAI *et al.* 2013).

Em nosso estudo verificamos que nas células Caco2 incubadas com 5-FU por 24h observa-se o aumento dos níveis de mRNA para TLR2 e TLR4, corroborando com os nossos resultados nos animais, onde também encontramos um aumento da expressão desses receptores no jejuno e no íleo dos animais tratados com 5-FU. Esse aumento dos níveis dos receptores toll-like causado pelo 5-FU nas células Caco2 foi ainda maior quando co-incubamos essas células com 5-FU + LPS que é um agonista de receptores toll-like, é um dos mais potentes agonistas de TLR4 que pode até mesmo afetar a resposta à quimioterapia do 5-FU (GARAY RP *et al.* 2007. PAULOS CM *et al.* 2007), nós mostramos que o 5-FU tem um efeito adicional ao efeito do LPS.

Um estudo de Homa Davoodi *et al.* (2013), já haviam demonstraram o efeito do 5-FU e do LPS sobre a expressão de diferentes variantes do TLR4, em células de câncer colorretal HCT116. Eles concluíram que o 5-FU induziu um aumento na expressão de TLR4 na presença e na ausência de LPS.

Nós observamos que o tratamento com 5-FU+LPS+SB conseguiu diminuir a expressão dos receptores toll-like quando comparados ao grupo 5-FU+LPS. Assim como, a

incubação de 5-FU+SB também foi capaz de reduzir o aumento da expressão de TLR2 e TLR4 quando comparados com as células incubadas somente com 5-FU.

É interessante ressaltar que a incubação com o SB sozinho foi capaz de aumentar a expressão de TLR2 e TLR4, mas esse aumento não é suficiente para causar a ativação de um processo inflamatório. Ele somente ativa a imunidade inata. Tem um papel protetor na mucosa intestinal. Pois os probióticos modulam a expressão dos TLRs e induzem a produção de citocinas (LI *et al.* 2014), e uma estimulação constante dos TLRs pode ser necessária para manutenção da homeostase imune (RAKOFF *et al.* 2004). No entanto, os receptores inatos desempenham um papel importante para equilibrar a redução de indução e inflamação no hospedeiro (WEN *et al.* 2011). Sugere-se que bactérias comensais podem agir como um anti-inflamatório através de uma inibição do fator de transcrição nuclear (NF- κ B) através da inibição da ubiquitinação do I κ B (NEISH *et al.* 2000). A administração oral de probióticos pode modular a resposta de células resultando no aumento da regulação da produção de citocinas (CHRISTENSEN *et al.* 2002).

Já haviam evidências que em condições normais, a estimulação da mucosa imune por microorganismos não patogênicos como SB, regula os TLR e a expressão de citocinas, que podem ter efeitos favoráveis sobre o desenvolvimento e manutenção do sistema imune e podem favorecer o hospedeiro com uma maior capacidade para resistir a qualquer resposta inflamatória (A. Kourelis *et al.* 2010).

Com base nos dados que obtivemos, sugerimos o seguinte modelo hipotético:

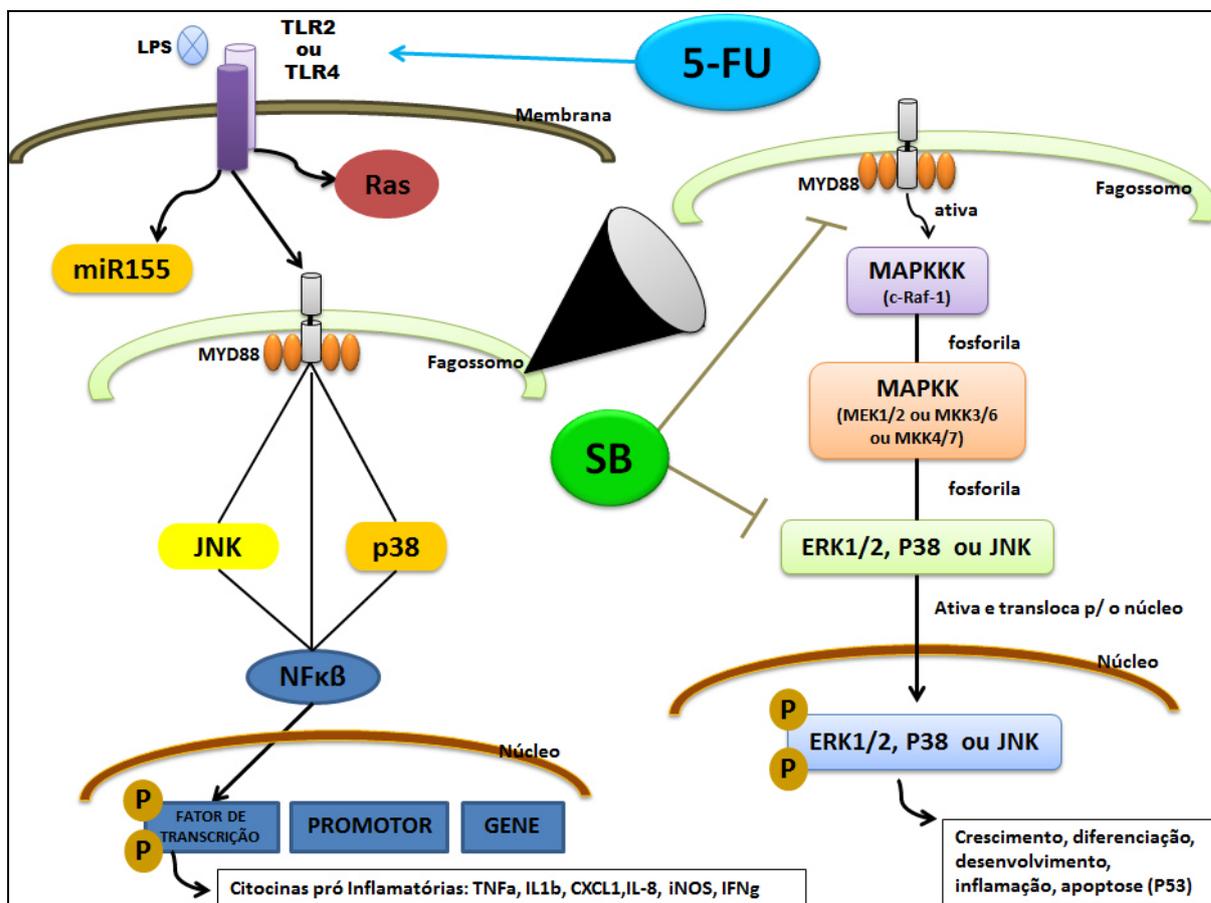


FIGURA 39 – Hipótese do Mecanismo de ação do *Saccharomyces boulardii*

Em nosso modelo hipotético, o 5-FU causa um quadro inflamatório, gerando diarreia e perda de peso nos animais, aumentando a migração de neutrófilos, causando necrose celular e alteração da histologia do intestino, causa também o aumento da produção de radicais livres e de óxido nítrico, aumentando a expressão de NF- κ B, de MAP quinases e de citocinas pró-inflamatórias, através da ativação de receptores IL-1, TLR 2 e TLR4 dependentes de MyD88. Na nossa hipótese o SB consegue reduzir esse quadro inflamatório aumentando a expressão de I κ B, causando assim uma diminuição da transcrição de NF- κ B. Interferindo na via MAP quinase por reduzir a fosforilação de ERK1/2, p38 e JNK. Resultando assim na atenuação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, e, por conseguinte reduzindo o quadro inflamatório geral, tanto nos animais como em células de adenocarcinoma colorretal.

Logo, sabendo que o *Saccharomyces boulardii* é um probiótico de baixo custo, tem uso conveniente, é uma droga não absorvida pelo hospedeiro, e desprovida de toxicidade. Podemos concluir que o SB fornece uma interessante abordagem alternativa de tratamento na mucosite intestinal induzida por 5-FU. O SB pode combater o processo inflamatório estabilizando o ambiente microbiano intestinal, a permeabilidade da barreira intestinal e a degradação de antígenos enterais alterando sua imunogenicidade. Podem também, mediar esse processo através do controle do equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias. Pode ser considerado como uma alternativa para alcançar efeitos intestinais profiláticos ou terapêuticos nas doenças inflamatórias intestinais.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

- ✓ *Saccharomyces boulardii* atenuou as alterações de perda de peso, diarreia, infiltração de neutrófilos e alterações histopatológicas causadas no modelo de lesão intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.
- ✓ *Saccharomyces boulardii* apresentou atividade anti-inflamatória no modelo de lesão intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.
- ✓ *Saccharomyces boulardii* alterou a via de sinalização celular, NFkB, em animais com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil e em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil.
- ✓ *Saccharomyces boulardii* atenuou o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil e em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil.
- ✓ *Saccharomyces boulardii* alterou a via de sinalização celular, MAP quinase, em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil.
- ✓ *Saccharomyces boulardii* alterou a sinalização da proteína adaptadora MyD88 na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.
- ✓ *Saccharomyces boulardii* alterou a expressão de receptores Toll-like 2 e Toll-like 4, na presença ou ausência de Lipopolissacarídeo (LPS), em células Caco2 incubadas com 5-Fluorouracil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD-NEJAD P *et al.* Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. **Eur. J. Immunol**, 32: 1958-1968, 2002.

AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signaling. **Nat Rev Immunol**, 4: 499-511, 2004.

A. KOURELIS, C. KOTZAMANIDIS, E. LITOPOULOU-TZANETAKI, J. PAPACONSTANTINO, N. TZANETAKIS AND M. YIANGOU. Immunostimulatory activity of potential probiotic yeast strains in the dorsal air pouch system and the gut mucosa. Journal compilation a 2010 The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology 109 (2010) 260–271

ALDRIDGE, P.D.; GRAY, M.A.; HIRST, B.H.; ANJAM KHAN, C.M. Who's talking to whom? Epithelial-bacterial pathogen interactions. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 655-663, 2005.

ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SOUTO FO, SPILLER F, PAULA-NETO H, SILVA JS, GAZZINELLI RT, TEIXEIRA MM, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 106(10): 4018-23, 2009.

ALVES-FILHO JC, TAVARES-MURTA BM, BARJA-FIDALGO C, BENJAMIM CF, BASILE-FILHO A, ARRAES SM, CUNHA FQ. Neutrophil function in severe sepsis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**. 2006 Jun;6(2):151-8. Review.

ATHMAN, R.; PHILPOTT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, p. 25-32, 2004.

ARANCIBIA SA, BELTRÁN CJ, AGUIRRE IM, SILVA P, PERALTA AL, MALINARICH F *et al.* Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**, 40(2): 97-112, 2007.

ARNOLD RJ, GABRAIL N, RAUT M *et al.* Clinical implications of chemotherapy-induced diarrhea in patients with cancer. **J Support Oncol**, 3:227-232, 2005.

BIELECKA M, MAJKOWSKA A. Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensoric properties of yoghurt powder. **Nahrung**. 2000 Aug;44(4):257-60.

BINES, J.E.; WALKER, W.A. Growth factors and the development of neonatal host defense. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 310, p. 31-39, 1991.

BLEHAUT H, MASSOT J, ELMER GW, LEVY RH. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. **Biopharm Drug Dispos**; 10: 353-364; 1989.

BODDY, A.V.; ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; LEVY, R.H. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. **Pharm. Res.**, v. 8, p. 796-800, 1991.

BOIRIVANT M, STROBER W. The mechanism of action of probiotics. **Curr Opin Gastroenterol**; 23: 679-692; 2007.

BOURLIOUX, P.; KOLETZKO, B.; GUARNER, F.; BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, p. 675-683, 2003.

BRANDAO RL, CASTRO IM, BAMBIRRA EA, *et al.* Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Environ Microbiol**, 64:564-568; 1998.

BRASIER, A. R.; JAMALUDDIN, M.; CASOLA, A.; DUAN, W.; SHEN, Q.; GAROFALO, R.P. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF- κ B1, and c-Rel transcription factors. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 3551-3561, 1998.

BUTS, J.P.; DE KEYSER, N.; STILMANT, C.; SOKAL, E.; MARANDI, S. *Saccharomyces boulardii* enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease. **Pediatr. Res.**, v. 51, p. 528-534, 2002.

BUTS, J.P.; DE KEYSER, N.; STILMANT, C.; DELEM, E.; SMETS, F.; SOKAL, E. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. **Pediatr. Res.**, v. 60, p. 24-29, 2006.

CAAMANO, J.; HUNTER, C.A. NF- κ B family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 414-429, 2002.

CANONICI A, SIRET C, PELLEGRINO E, PONTIER-BRES R, POUYET L, MONTERO MP, COLIN C, CZERUCKA D, RIGOT V, ANDRÉ F. *Saccharomyces boulardii* Improves Intestinal Cell Restitution through Activation of the α 2 β 1 Integrin Collagen Receptor. Inserm, UMR 911, Centre de Recherche en Oncologie et Oncopharmacologie, Marseille, France. **PLoS One**. 2011.

CARNEIRO-FILHO BA, ORIA RB, REA KW, BRITO GA, FUJII J, OBRIG T, LIMA AA, GUERRANT RL. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-Fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition** 20: 934 – 941; 2004.

CHANG CT, HO TY, LIN H, LIANG JA, HUANG HC, LI CC, ET AL. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. **PLoS One** 2012.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Int. J. Dairy Technol., Long Hanborough**, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

CHENG, H.; LEBLOND, C.P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. Parts I-V. **Am. J. Anat.**, v. 141, p. 461-562, 1974.

CHEN, Z.; GIBSON, T.B.; ROBINSON, F.; SILVESTRO, L.; PEARSON, G.; XU, B.; WRIGHT, A.; VANDERBILT, C.; COBB, M.H. MAP kinases. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2449-2476, 2001.

CHEN, X.; KOKKOTOU, E.G.; MUSTAFA, N.; BHASKAR, K.R.; SOUGIOULTZIS, S.; O'BRIEN, M.; POTHOUKAKIS, C.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both *in vitro* and *in vivo* and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 24449-24454, 2006.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHRISTENSEN P, OLSEN N, KROGH K, LAURBERG S . Scintigraphic assessment of colostomy irrigation. **Colorectal Dis.** 2002 Sep;4(5):326-331.

CLEVERS H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, 118: 671-674, 2004.

COATES, N.J. AND MCCOLL, S.R. (2001) Production of chemokines *in vivo* in response to microbial stimulation. **J Immunol** 166, 5176–5182.

COHEN P, MIYAZAKI M, SOCCI ND, HAGGE-GREENBERG A, LIEDTKE W, SOUKAS AA, SHARMA R, HUDGINS LC, NTAMBI JM, FRIEDMAN JM. Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. **Science.** 2002 Jul 12;297(5579):240-3.

COWLEY, S.; PATERSON, H.; KEMP, P.; MARSHALL, C.J. Activation of MAP kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. **Cell**, v. 77, p. 841-852, 1994.

CUNHA CB, Revisão de Literatura – Quimioterapia (QT). Avaliação da eficácia do tratamento para mucosite oral induzida por 5- fluoruracil, com uso de *laser* de baixa potência em diferentes comprimentos de onda. **Dissertação** (Mestrado Profissional na área de *Lasers* em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CURRA M, MARTINS MA, LAUXEN IS, PELLICOLI AC, SANT'ANA FILHO M, PAVESI VC, CARRARD VC, MARTINS MD. Effect of topical chamomile on immunohistochemical levels of IL-1 β and TNF- α in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2013 Feb;71(2):293-9. doi: 10.1007/s00280-012-2013-9. Epub 2012 Oct 25.

CUSCHIERI, J.; MAIER R.V. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). **Crit. Care Med.**, v. 33, p. S417-S419, 2005.

CZERUCKA D, DAHAN S, MOGRABI B, et al. Implication of mitogenactivated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Infect Immun**, 69:1298-1305; 2001.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 733-739, 2002.

CZERUCKA, D.; DAHAN, S.; MOGRABI, B.; ROSSI, B.; RAMPAL, P. Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1298-1305, 2001.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 26, p. 767-778, 2007.

CZERUCKA, D.; DAHAN, S.; MOGRABI, B.; ROSSI, B.; RAMPAL, P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 5998-6004, 2000.

DAHAN, S.; BUSUTTIL, V.; IMBERT, V.; PEYRON, J.F.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappaB and AP-1 in T84 cells. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 2304-2310, 2002.

DAHAN S, DALMASSO G, IMBERT V, ET AL. *Saccharomyces boulardii* interferes with enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced signaling pathways in T84 cells. **Infect Immun** 2003; 71: 766773.

DALMASSO, G.; COTTREZ, F.; IMBERT, V.; LAGADEC, P.; PEYRON, J.F.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D.; GROUX, H.; FOUSSAT, A.; BRUN, V. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. **Gastroenterology**, v. 131, p. 1812-1825, 2006a.

DALMASSO, G.; LOUBAT, A.; DAHAN, S.; CALLE, G.; RAMPAL, P.; CZERUCKA, D. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF-alpha-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 456-465, 2006b.

DAVIS, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. **Biochem. Soc. Symp.**, v. 64, p. 1-12, 1999.

DAVOODI H¹, HASHEMI SR, SEOW HF. 5-Fluorouracil Induce the Expression of TLR4 on HCT116 Colorectal Cancer Cell Line Expressing Different Variants of TLR4. **Iran J Pharm Res.** 2013 Spring;12(2):453-60.

DE KONING BAE, VAN DIEREN JM, LINDENBERGH-KORTLEVE DJ, VAN DER SLUIS M, MATSUMOTO T, YAMAGUCHI K, EINERTHAND AW, SAMSOM JN, PIETERS R, NIEUWENHUIS EES. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **Int Immunol** 24:1-9; 2006.

DE LA CRUZ-MORCILLO MA, GARCÍA-CANO J, ARIAS-GONZÁLEZ L, GARCÍA-GIL E, ARTACHO-CORDÓN F, RÍOS-ARRABAL S, VALERO ML, CIMAS FJ, SERRANO-OVIEDO L, VILLAS MV, ROMERO-FERNÁNDEZ J, NÚÑEZ MI, SÁNCHEZ-PRIETO R. Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. **Cancer Lett.** 2013 Jul 10;335(1):66-74. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.050. Epub 2013 Feb 8.

DE KONING BA, VAN DIEREN JM, LINDENBERGH-KORTLEVE DJ, VAN DER SLUIS M, MATSUMOTO T, YAMAGUCHI K, EINERHAND AW, SAMSOM JN, PIETERS R, NIEUWENHUIS EE. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **Int Immunol**. 2006 Jun;18(6):941-9.

DEFORGE, L.E.; PRESTON, A.M.; TAKEUCHI, E.; KENNEY, J.; BOXER, L.A.; REMICK, D.G. Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 25568-25576, 1993.

De GRAMONT A; FIGER, A; SEYMOUR M. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol** 18: 2938-2947, 2000.

DIAMOND, R.D., LYMAN, C.A. AND WYSONG, D.R. (1991) Disparate effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor- alpha on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. **Clin Invest** 87, 711-720.

DINICOLA S, MORINI V, COLUCCIA P, PROIETTI S, D'ANSEMI F, PASQUALATO A, MASIELLO MG, PALOMBO A, DE TOMA G, BIZZARRI M, CUCINA A. Nicotine increases survival in human colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. **Toxicol In Vitro**. 2013 Dec;27(8):2256-63. doi: 10.1016/j.tiv.2013.09.020. Epub 2013 Oct 2.

DIDIERLAURENT, A.; SIRARD, J.C.; KRAEHENBUHL, J.P.; NEUTRA, M.R. How the gut senses its content. **Cell. Microbiol.**, v. 4, p. 61-72, 2002.

DIJKSTRA, G., MOSHAGE, H., VAN DULLEMEN, H. M., DE JAGER-KRIKKEN, A., TIEBOSCH, A. T., KLEIBEUKER, J. H., JANSEN, P. L., AND VAN GOOR, H. Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. **J Pathol** 186, 416-421; 1998.

DOHERTY GM, DOPPMAN JL, SHAWKER TH, MILLER DL, EASTMAN RC, GORDEN P, NORTON JA. Results of a prospective strategy to diagnose, localize, and resect insulinomas. **Surgery**. 1991 Dec;110(6):989-96; discussion 996-7.

DOYLE, S.E., O'CONNELL, R.M., MIRANDA, G.A., VAIDYA, S.A., CHOW, E.K., LIU, P.T., SUZUKI, S., SUZUKI, N. ET AL. (2004) Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. **J Exp Med** 199, 81-90.

DUNCAN M, GRANT G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther** 18: 853 - 874; 2003.

ECKMANN, L. Defense molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 21, p. 147-151, 2005.

ELMER GW, SURAWICZ CM, MCFARLAND LV. Biotherapeutic agents: A neglected modality for the treatment and prevention of the intestinal and vaginal infections. **JAMA**, 275:870-876; 1996.

ELMER GW, MCFARLAND LV, SURAWICZ CM, DANKO L, GREENBERG RN. Behaviour of *Saccharomyces boulardii* in recurrent *Clostridium difficile* disease patients. **Aliment Pharmacol Ther**; 13: 1663-1668; 1999.

ELMER GW, MCFARLAND LV, MCFARLAND M. Chapter 1. Introduction. In: The power of probiotics: improving your health with beneficial microbes. **Binghamton, NY: Haworth Press, 2007.**

ELTING LS, COOKSLEY C, CHAMBERS M, CANTOR SB, MANZULLO E, RUBENSTEIN EB. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, 98 (7): 1531-1539, 2003.

ELTING LS, COOKSLEY CD, CHAMBERS MS, GARDEN AS. Risk, outcomes, and costs of Radiation-Induced Oral Mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 68(4):1110-20, 2007.

EYKING A, EY B, RÜNZI M, ROIG AI, REIS H, SCHMID KW, GERKEN G, PODOLSKY DK, CARIO E. Toll-like receptor 4 variant D299G induces features of neoplastic progression in Caco-2 intestinal cells and is associated with advanced human colon cancer. **Gastroenterology** 2011; 141: 2154-2165 [PMID: 21920464 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.08.043

FALK, P.G.; HOOPER, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.I. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 1157-1170, 1998.

FAURSCHOU M, BORREGAARD N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.** The Granulocyte Research Laboratory, Department of Haematology, Rigshospitalet 4042, University of Copenhagen, 9 Blegdamsvej, DK-2100 Copenhagen OE, Denmark. 2003.

FERREIRA TM, LEONEL AJ, MELO MA, SANTOS RR, CARA DC, CARDOSO VN, CORREIA MI, ALVAREZ-LEITE JI. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. **Lipids**. 2012 Jul;47(7):669-78. doi: 10.1007/s11745-012-3680-3. Epub 2012 May 31.

FIDAN I, KALKANCI A, YESILYURT E, YALCIN B, ERDAL B, KUSTIMUR S, IMIR T. Effects of *Saccharomyces boulardii* on cytokine secretion from intraepithelial lymphocytes infected by *Escherichia coli* and *Candida albicans*. **Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine**, Gazi University, Ankara, Turkey. 2008.

FLORASTOR, 2007. **Disponível em <http://www.florastor.com>**. Acessado em 01 de julho de 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint FAO/WHO Working Group Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **London, Ontario, Canada**. May 1, 2002. Acessado 25 de maio de 2011. Disponível em: URL: <ftp://ftp.fao.org/esn/food/wgreport2.pdf>

FRANCHIMONT D, VERMEIRE S, EL HOUSNI H, PIERIK M, VAN STEEN K, GUSTOT T, QUERTINMONT E, ABRAMOWICZ M, VAN GOSSUM A, DEVIERE J, RUTGEERTS P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, 53: 987-992, 2004.

FRANK M, HENNENBERG EM, EYKING A, RÜNZI M, GERKEN G, SCOTT P, PARKHILL J, WALKER AW, CARIO E. TLR signaling modulates side effects of anticancer therapy in the small intestine. **J Immunol.** 2015 Feb 15;194(4):1983-95. doi: 10.4049/jimmunol.1402481. Epub 2015 Jan 14.

FRESHNEY, N.W.; RAWLINSON, L.; GUESDON, F.; JONES, E.; COWLEY, S.; HSUAN, J.; SAKLATVALA, J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. **Cell**, v. 78, p. 1039-1049, 1994.

FULLER, R. The effect of Probiotics on the gut micro-ecology farm animals. In: **WOOD, B.J.B.** The lactic acid bacteria – The lactic acid bacteria in health and disease. v. 1. London: Chapman & Hal, p. 171-192; 1992.

FUKATA M, SHANG L, SANTAOLALLA R, SOTOLONGO J, PASTORINI C, ESPAÑA C, UNGARO R, HARPAZ N, COOPER HS, ELSON G, KOSCO- VILBOIS M, ZAIAS J, PEREZ MT, MAYER L, VAMADEVAN AS, LIRA SA, ABREU MT. Constitutive activation of epithelial TLR4 augments inflammatory responses to mucosal injury and drives colitis-associated tumorigenesis. **Inflamm Bowel Dis** 2011; **17**: 1464-1473 [PMID: 21674704 DOI: 10.1002/ibd.21527]

FURNESS, J.B.; KUNZE, W.A.; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G922-G928, 1999.

GARAY RP, ALDA O. What can we learn from erythrocyte Na-K-Cl cotransporter NKCC1 in human hypertension? **Pathophysiology.** 2007 Dec;14(3-4):167-70. Epub 2007 Oct 17.

GIRARD, P., PANSART, Y., AND GILLARDIN, J. M. Inducible nitric oxide synthase involvement in the mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhoea in rats. **Nitric Oxide** *13*, 163-169; 2005.

GIRARD, P.; PANSART, Y.; LORENTE, I.; GILLARDIN, J.M. Dose-response relationship and mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhea in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 48, p. 770-774, 2003.

GIRARD, P.; PANSART, Y.; GILLARDIN, J.M. Inducible nitric oxide synthase involvement in the mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhoea in rats. **Nitric Oxide**, v. 13, p. 163-169, 2005a.

GIRARD, P.; PANSART, Y.; COPPE, M.C.; GILLARDIN, J.M. *Saccharomyces boulardii* inhibits water and electrolytes changes induced by castor oil in the rat colon. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, p. 2183-2190, 2005b.

GIBSON RJ, KEEFE DM. Cancer chemotherapy-induced Diarrhea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer.** 14(9): 890–90, 2006

GIBSON RJ, BOWEN JM, ALVAREZ E, FINNIE J, KEEFE DM. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy.**53(5):360-9, 2007.

GIBSON RJ, KEEFE DM, LALLA RV, BATEMAN E, BLIJLEVEN N, FIJLSTRA M, KING EE, STRINGER AM, VAN DER VELDEN WJ, YAZBECK R, ELAD S, BOWEN JM. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**. 21(1):313-26, 2013.

GOPAL PK, PRASAD J, SMART J, et al. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Int J Food Microbiol**, 67:207-216, 2001.

GOLDBERG RM, GILL S. Recent phase III trials of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin as chemotherapy for metastatic colorectal cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**. 54 (1):S57-64, 2004.

GRAFF S, CHAUMEIL JC, BOY P, LAI-KUEN R, CHARRUEAU C. Influence of pH conditions on the viability of *Saccharomyces boulardii* yeast. **J Gen Appl Microbiol**; 54: 221-227; 2008.

HAFEEZ A, TARIQ P, ALI S, KUNDI ZU, KHAN A, HASSAN M. The efficacy of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of acute watery diarrhea in children: A multicentre randomized controlled trial. **J of The College of Physicians and Surgeons Pakistan**. 2002.

HAN, J.; LEE, J.D.; BIBBS, L.; ULEVITCH, R.J. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science**, v. 265, p. 808-811, 1994.

HAUSMANN M, KIESSLING S, MESTERMANN S, WEBB G, SPÖTTL T, ANDUS T, SCHÖLMERICH J, HERFARTH H, RAY K, FALK W, ROGLER G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. **Gastroenterology**. 2002 Jun;122(7):1987-2000.

HERRSTEDT J. Prevention and management of mucositis in patients with cancer. **Int J Antimicrob Agents**. 2000 Oct;16(2):161-3. Review.

HILL, C.S.; TREISMAN, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. **Cell**, v. 80, p. 199-211, 1995.

HOBBIE, S.; CHEN, L.M.; DAVIS, R.J.; GALÁN, J.E. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 159, p. 5550-5559, 1997.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80, p. 225-236, 1995.

HTWE K, YEE KS, TIN M, et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* in the Treatment of Acute Watery Diarrhea in Myanmar Children: A Randomized Controlled Study. **Am J Trop Med Hyg**, 78:214-216, 2008.

ICHIJO, H. From receptors to stress-activated MAP kinases. **Oncogene**, v. 18, p. 6087- 6093, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). Estimativa 2013: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2016.

JAWHARA S, POULAIN D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. *Physiopathologie des Candidoses, Faculté de Médecine, CHRU Lille, France. Med Mycol.* 2007.

JAWHARA, S.; POULAIN, D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. **Med. Mycol.**, v. 18, p. 1-10, 2007.

JANEWAY, C.A. JR; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, p. 637-646, 2003.

JESPERSEN, L. VAN DER AA KUHLE, A.; The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 26, p. 564-571, 2003.

JERPESEN, L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. **FEMS Yeast Research.** v.3, p.191-200, 2003.

JELLEN, P.; LUTZ, S. *Functional milk and dairy products*. In: MAZZA, G., ed. *Functional foods: biochemical and processing aspects*. **Lancaster: Technomic Publishing**, p.357-381, 1998.

JOBIN, C.; SARTOR, R.B. The I κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 278, p. C451-C462, 2000.

JUSTINO, P. F. ET AL. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Nutr**, v. 111, n. 9, p. 1611-21, May 2014. ISSN 0007-1145.

JUSTINO PF, MELO LF, NOGUEIRA AF, MORAIS CM, MENDES WO, FRANCO AX, SOUZA EP, RIBEIRO RA, SOUZA MH, SOARES PM. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2015 Mar;75(3):559-67. doi: 10.1007/s00280-014-2663-x. Epub 2015 Jan 9.

KANG MK, KIM MS, KIM JH. Clinical outcomes of mild hyperthermia for locally advanced rectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. **Int J Hyperthermia.** 2011;27(5):482-90. doi: 10.3109/02656736.2011.563769

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptor downstream signaling. **Arthritis Res. Ther.**, v. 7, p. 12-19, 2005.

KAWAI T, ADACHI O, OGAWA T, TAKEDA K, AKIRA S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, 11(1): 115-22, 1999.

KAWAI T, AKIRA S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **Int Immunol**, 21: 317-337, 2009.

KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update of Toll-like receptors. **Nature Immunology**. 11 (5): 373-384, 2010.

KAWASHIMA R¹, KAWAKAMI F, MAEKAWA T, YAMAMOTO H, KOIZUMI W, ICHIKAWA T. Elemental diet moderates 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis through mucus barrier alteration. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2015 Jun 6.

KASAHARA, T.; MUKAIDA, N.; YAMASHITA, K.; YAGISAWA, H.; AKAHOSHI, T.; MATSUSHIMA, K. IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. **Immunology**, v. 74, p. 60-67, 1991.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

KATSOULIDIS, E.; LI, Y.; MEARS, H.; PLATANIAS, L.C. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway in interferon signal transduction. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 25, p. 749-756, 2005.

KEEFE DM, GIBSON RJ. Mucosal injury from targeted anti-cancer therapy. **Support Care Cancer**, 15: 483-90, 2007.

KEEFE, DM *et al.* Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. **Cancer**, 109:820–31, 2007.

KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2.ed. Washington: ASM, p.797-811; 2001.

KLEIN, S.M.; ELMER, G.W.; MCFARLAND, L.V.; SURAWICZ, C.M.; LEVY, R.H. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. **Pharm. Res.**, v. 10, p. 1615-1619, 1993.

KEDINGER, M.; DULUC, I.; FRITSCH, C.; LORENTZ, O.; PLATEROTI, M.; FREUND, J.N. Intestinal epithelial-mesenchymal cell interactions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 859, p. 1-17, 1998.

KOLCH, W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem. J.**, v. 351, p. 289-305, 2000.

KOENIG, H.; PATEL, A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. **Arch neurol.**, v.23 (2), p. 155-160; 1970.

KYRIAKIS, J.M.; AVARUCK, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol. Rev.**, v. 81, p. 807-869, 2001.

LAHTI, A.; JALONEN, U.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one reduces inducible nitric oxide synthase expression by destabilizing mRNA in activated macrophages. **Mol. Pharmacol.**, v. 64, p. 308-315, 2003.

LEE, S.K.; KIM, H.J.; CHI, S.G.; JANG, J.Y.; NAM, K.D.; KIM, N.H.; JOO, K.R.; DONG, S.H.; KIM, B.H.; CHANG, Y.W.; LEE, J.I.; CHANG, R. *Saccharomyces boulardii* activates expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in HT-29 cells. **Korean J. Gastroenterol.**, v. 45, p. 328-334, 2005.

LEE, J.C.; LAYDON, J.T.; MCDONNELL, P.C.; GALLAGHER, T.F.; KUMAR, S.; GREEN, D.; MCNULTY, D.; BLUMENTHAL, M.J.; HEYS, J.R.; LANDVATTER, S.W. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature**, v. 372, p. 739-746, 1994.

LEE SK, KIM YW, CHI SG, JOO YS, KIM HJ. The effect of *Saccharomyces boulardii* on human colon cells and inflammation in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. **Dig Dis Sci.** 2009 Feb;54(2):255-63. doi: 10.1007/s10620-008-0357-0. Epub 2008 Jul 10.

LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. C. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59 (5), p.603-612, 2007.

LEOCÁDIO PC, ANTUNES MM, TEIXEIRA LG, LEONEL AJ, ALVAREZ-LEITE JI, MACHADO DC, GENEROSO SV, CARDOSO VN, CORREIA MI. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-FU in mice. **Nutr Cancer.** 2015;67(3):486-93. doi: 10.1080/01635581.2015.1004730. Epub 2015 Mar 24.

LIN HY, TANG CH, CHEN YH, WEI IH, CHEN JH, LAI CH, LU DY. Peptidoglycan enhances proinflammatory cytokine expression through the TLR2 receptor, MyD88, phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and NF-kappaB pathways in BV-2 microglia. **Int Immunopharmacol.** 2010; 10: 883-91. doi: 10.1016/j.intimp.2010.04.026 PMID: 20451669

LIEW FY, XU D, BRINT EK, O'NEILL LAJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature Rev Immun.** 5: 446-458, 2005.

LI TT, OGINO S, QIAN ZR. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. **World J Gastroenterol.** 2014 Dec 21;20(47):17699-708. doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17699.

LIEVIN-LE MOAL, V.; SERVIN, A.L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, p. 315-337, 2006.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330-8, May 2003. ISSN 1474-175X.

LOGAN RM, STRINGER AM, BOWEN JM, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DM. Serum levels of NF-kappaB and drug pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol Ther**, 7 (7): 1139-45, 2008a.

LONGLEY DB, HARKIN D, JOHNSTON PG. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nat Rev Cancer** 3: 330 – 338; 2003.

LOUVARD, D.; KEDINGER, M.; HAURI, H.P. The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 8, p. 157-195, 1992.

MAI CW, KANG YB, PICHIKA MR. Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. **Onco Targets Ther** 2013; **6**: 1573-1587 [PMID: 24235843 DOI: 10.2147/OTT.S50838]

MACKIE, R.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.69, p. 1035S-1045S, 1999.

MAGNUSSON, K.E.; STJERNSTROM, I. Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (sIgA), IgG and mucins on the surface properties and association of salmonellae with intestine and granulocytes. **Immunology**, v. 45, p. 239-248, 1982.

MARTINS FS, NEVES MJ, ROSA CA, et al. Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii*. **RBM** 62: 151-155; 2005.

MARTINS, F.S.; NARDI, R.M.D.; ARANTES, R.M.E.; ROSA, C.A.; NEVES, M.J. AND NICOLI, J.R. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 83-92, 2005a.

MARTINS, F.S.; NEVES, M.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; PENNA, F.J. & NICOLI, J.R. Comparação de seis produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii*. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 62, p. 151-155, 2005b.

MARTINS FS, BARBOSA FHF, NICOLI JR. O probiótico *Saccharomyces boulardii*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 9. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=50016937014>. ISSN 1519-5228. 2009.

MARSHALL, J.C. Gastrointestinal flora and its alterations in critical illness. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 2, p. 405-411, 1999.

MARSHALL, C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. **Cell**, v. 80, p. 179-185, 1995.

MARTINS FS, BARBOSA FHF, NICOLI JR. O probiótico *Saccharomyces boulardii*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, vol. 9. Disponible en Internet: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=50016937014>. ISSN 1519-5228. 2009.

MARTINS FS, DALMASSO G, ARANTES RM, DOYE A, LEMICHEZ E, LAGADEC P, IMBERT V, PEYRON JF, RAMPAL P, NICOLI JR, CZERUCKA D. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. **PLoS One**. 2010 Jan 27;5(1):e8925. doi: 10.1371/journal.pone.0008925.

MASTRONARDE, J.G.; MONICK, M.M.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K.; HUNNINGHAKE, G.W. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 1275-1281, 1998.

MCFARLAND LV. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. **Anaerobe**; 15: 274-280, 2009.

MCFARLAND LV. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World J Gastroenterol.** vol.16, pag.5, 2010.

MCFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 12, p. 193-207, 2000.

MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 6, p. 157-171, 1993.

MCCRACKEN, V.J.; GASKINS, H.R. Probiotics and the immune system. *In* **Probiotics a Critical Review**. Tannock, G.W. (ed.). Norfolk, England: Horizon Scientific Press, p. 85-111, 1999.

MCGETTRICK AF, O'NEILL LAJ. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion in Immunology**, 22(1): 20-7, 2010.

MEDEIROS JV, GADELHA GG, LIMA SJ, GARCIA JA, SOARES PM, SANTOS AA, BRITO GA, RIBEIRO RA, SOUZA MH. Role of the NO/cGMP/K(ATP) pathway in the protective effects of sildenafil against ethanol-induced gastric damage in rats. **Br J Pharmacol.** 2008.

MEDEIROS CA, LEITÃO RF, MACEDO RN, BARBOZA DR, GOMES AS, NOGUEIRA NA, ALENCAR NM, RIBEIRO RA, BRITO GA. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2010.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 135-145, 2001.

MEDZHITOV R. Toll like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, 1: 135-145, 2003.

MEDZHITOV R, JANEWAY C JR. The Toll receptor family and microbial recognition. **Trends Microbiol.** 8(10):452-6, 2000.

MELO, ML.; BRITO, GA.; SOARES, RC.; CARVALHO, SB.; SILVA, JV.; SOARES, PM.; VALE, ML.; SOUZA, MH.; CUNHA, FQ.; RIBEIRO, RA. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.**; 2008.

MONTGOMERY, R.K.; MULBERG, A.E.; GRAND, R.J. Development of the human gastrointestinal tract: twenty years of progress. **Gastroenterology**, v. 116, p. 702-731, 1999.

MURZYN A, KRASOWSKA A, STEFANOWICZ P, DZIADKOWIEC D, ŁUKASZEWICZ M. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, Wrocław, Poland. **PLoS One**. 2010.

MURAYAMA, T.; OHARA, Y.; OBUCHI, M.; KHABAR, K.S.A.; HIGASHI, H.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1 and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. **J. Virol.**, v. 71, p. 5692- 5695, 1997.

NEISH AS, GEWIRTZ AT, ZENG H, YOUNG AN, HOBERT ME, KARMALI V, RAO AS, MADARA JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. **Science**. 2000 Sep 1;289(5484):1560-3.

NETEA MG, VAN DEUREN M, KULLBERG BJ, CAVAILLON JM, VAN DER MEER JW. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?. **Trends Immunol**, 23(3): 135-9, 2003.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, p. 749-755, 2004.

NG SC, HART AL, KAMM MA, STAGG AJ, KNIGHT SC. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**; 15: 300-310; 2009.

NIEDZIELSKA I, NIEDZIELSKI Z, TKACZ M, ORAWCZYK T, ZIAJA K, STARZEWSKI J, MAZUREK U, MARKOWSKI J. Toll-like receptors and the tendency of normal mucous membrane to transform to polyp or colorectal cancer. **J Physiol Pharmacol**. 2009 May;60 Suppl 1:65-71.

OHMOTO, Y.; IMAGAWA, K.; KIKUCHI, M.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. **Infec. Immun.**, v. 65, p. 3218-3224, 1997.

O'LEARY DP, BHATT L, WOOLLEY JF, GOUGH DR, WANG JH, COTTER TG, REDMOND HP. TLR-4 signalling accelerates colon cancer cell adhesion via NF-kB mediated transcriptional up-regulation of Nox-1. **PLoS One** 2012; 7: e44176 [PMID: 23071493 DOI: 10.1371/journal.pone.0044176

O'NEIL LA, BOWIE AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-Like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, 7(5):353-64, 2007.

OUELLETTE, A.J. IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G257-G261, 1999.

PARK BS, SONG DH, KIM HM, CHOI BS, LEE H, LEE JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD2 complex. **Nature**, 458 (7242): 1191-5, 2009.

PAULOS CM, WRZESINSKI C, KAISER A, HINRICHS CS, CHIEPPA M, CASSARD L, PALMER DC, BONI A, MURANSKI P, YU Z, GATTINONI L, ANTONY PA, ROSENBERG SA, RESTIFO NP. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8⁺ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2197-204. **Erratum in: J Clin Invest**. 2007. Oct;117(10):3140.

PODOLSKY DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 347: 417–429, 2002.

PESSINO A, SOBRERO A. Optimal treatment of metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 6(5):801-12, 2006.

PICO, J-L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. *Oncologist*, v. 3, p. 446-451, 1998.

PIRZADA, N.A.; ALI, I.I.; DAFER, R.M.; Fluorouracil-induced neurotoxicity. *Ann Pharmacotherapy*, v.34, n.1, p.35-38, 2000.

PHILPOTT, D.J.; GIRARDIN, S.E. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.*, v. 41, p. 1099-1108, 2004.

POTHOULAKIS C. Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*; 30: 826-833; 2009.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S. & MEDZHITOV, R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241 (2004).

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Quimioterapia do câncer**. In. Farmacologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 42, p. 557-75; 2008.

RAINGEAUD, J.; GUPTA, S.; ROGERS, J.S.; DICKENS, M.; HAN, J.; ULEVITCH, R.J.; DAVIS, R.J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.*, v. 270, p. 7420-7426, 1995.

REUTER BK, PIZARRO TT. Commentary: the role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe? *Eur J Immunol*. 2004 Sep;34(9):2347-55.

REAVES TA, CHIN AC, PARKOS CA. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 (suppl 1):191–198; 2005.

RIBEIRO,R.A.; FREITAS, H.C.; CAMPOS, M.C.; SANTOS, C.C.; FIGUEIREDO, F.C.; BRITO, G.A.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J. Urol.*, v.167, n. 5, p. 2229-34, 2002.

- RODRIGUES AC, NARDI RM, BAMBIRRA EA, et al. Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. **J Appl Bacteriol**, 81: 251-256; 1996.
- RODRIGUES, A. C., CARA, D. C., FRETEZ, S. H., CUNHA, F. Q., VIEIRA, E. C., NICOLI, J. R., AND VIEIRA, L. Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates IgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **J Appl Microbiol** 89, 404-414; 2000.
- ROUSE, J.; COHEN, P.; TRIGON, S.; MORANGE, M.; ALONSO-LLAMAZARES, A.; ZAMANILLO, D.; HUNT, T.; NEBREDA, A.R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. **Cell**, v. 78, p. 1027-1037, 1994.
- RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization of uracil-2-C14 by preneoplastic rat liver and rat hepatoma. **Cancer Res**, v. 14, n. 2, p. 119-23, Feb 1954. ISSN 0008-5472.
- RUBENSTEIN EB1, PETERSON DE, SCHUBERT M, KEEFE D, MCGUIRE D, EPSTEIN J, ELTING LS, FOX PC, COOKSLEY C, SONIS ST. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, 100 (9): 2016-46, 2004.
- SAAD, SUSANA MARTA ISAY. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 1, Mar. 2006.
- SALEZ, L.; MALO, D. Protagonists of innate immunity during in *Salmonella* infections. **Med. Sci. (Paris)**, v. 20, p. 1119-1124, 2004.
- SANCHO E, BATTLE E, CLEVERS H. Signalling pathways in intestinal development and cancer. **Nat Rev Cell Dev Biol**, 20:695-723, 2004.
- SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 31, p. 107-133, 1977.
- SAVAGE, D.C. Mucosal microbiota. In **Mucosal Immunology**. OGRA, P.L.; MESTECKY, J.; LAMM, M.E.; STROBER, W.; BIENENSTOCK, J.; MCGHEE, J.R. (Eds). San Diego: Academic Press, p. 19-30, 1999.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.
- SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; ONNELA, T. Gut flora in normal and disorders status. **Chemotherapy**, v. 41, p. 5-15, 1995.
- SARTOR RB. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**. 106:533-539; 1994.
- SCHMIDT-SUPPRIAN, M.; BLOCH, W.; COURTOIS, G. ADDICKS, K.; ISRAEL, A.; RAJEWSKY, K.; PASPARAKIS, M. NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. **Mol. Cell**, v. 5, p. 981-992, 2000.

SCHMIDT-CHOUDHURY A, FURUTA GT, LAVIGNE JA, GALLI SJ, WERSHIL BK. The regulation of tumor necrosis factor-alpha production in murine mast cells: pentoxifylline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF-alpha by distinct mechanisms. **Cell Immunol.** 1996 Jul 10;171(1):140-6.

SCHWARZ EM, O'KEEFE RJ, LOONEY RJ. Bone implant interface, osteolysis and potential therapies. **J Musculoskelet Neuronal Interact.** 2004 Dec;4(4):390-2. Review. No abstract available.

SCULLY C, SONIS S, DIZ PD. Oral mucositis. **Oral Dis.**, 12(3): 229-241, 2006.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kB by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, p. 921-928, 1986.

SEZER A, USTA U, CICIN I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. Department of General Surgery, Faculty of Medicine, Trakya University, Edirne, Turkey. **Med Oncol.**; 26(3):350-7; 2008.

SHAPIRO, L.; DINARELLO, C.A. Osmotic regulation of cytokine synthesis *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 12230-12234, 1995.

SHAN JY, JI WZ, LI HT, TUXUN T, LIN RY, WEN H. TLR2 and TLR4 expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic cystic echinococcosis and its relationship with IL-10. **Parasite Immunol.** 2011 Dec;33(12):692-6. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01335.x.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **Int. Dairy J., Amsterdam**, v.7, p.349-356, 1997.

SHIUH-BIN FANG & HSIN-YU SHIH & CHIH-HUNG HUANG & LI-TING LI & CHIA-CHUN CHEN & HSU-WEI FANG. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. **Support Care Cancer** (2014) 22:1647–1654.

SLACK JL *et al.* Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. **J. Biol. Chem.** 275: 4670-4678, 2000.

SMITH, SANDY. **Fotomicrografia eletrônica do Saccharomyces boulardii**. Dpt de Ciência dos Alimentos da Universidade de Guelph, Canadá. Disponível em: <http://www.institut-rosell-lallemand.com/page.php?idPage=32&idCatMere=-3&idLangue=2>. Acessada em: 09.11.2010.

SOUGIOULTZIS, S.; SIMEONIDIS, S.; BHASKAR, K.R.; CHEN, X.; ANTON, P.M.; KEATES, S.; POTHOUKAKIS, C.; KELLY, C.P. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 343, p. 69-76, 2006.

SOARES PM, MOTA JM, GOMES AS, OLIVEIRA RB, ASSREUY AM, BRITO GA, SANTOS AA, RIBEIRO RA, SOUZA MH. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts the resolution of inflammatory process. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2008.

SOARES PM, JOSÉ MAURÍCIO S.C. MOTA, EMMANUEL P. SOUZA, PRISCILLA F.C. JUSTINO, ALVARO X. FRANCO, FERNANDO Q. CUNHA, RONALDO A. RIBEIRO, MARCELLUS H.L.P. SOUZA. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine** 61 (2013) 46–49

SOARES PM, LIMA-JUNIOR RC, MOTA JM, JUSTINO PF, BRITO GA, RIBEIRO RA, CUNHA FQ, SOUZA MH. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2010.

SONIS, ST.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L. J.; LUCEY, C. A.; WANG, L.; MASON, L.; LOGIN, G.; YMAMKAWA, M.; MOSES, G.; BOUCHARD, P.; HAYES, L. L.; BEDROSIAN, C.; DORNER, A. J. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral. Oncol.**, v. 36(4), p. 373–81, 2000.

SONIS ST. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer** 4: 277 – 284; 2004.

SONIS, ST.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, suppl. 9, p. 1995-2025, 2004.

SOUGIOULTZIS S, SIMEONIDIS S, BHASKAR KR, CHEN X, ANTON PM, KEATES S, POTHOUKAKIS C, KELLY CP; *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006 Apr 28;343(1):69-76.

SOUZA, MM; AGUILAR-NASCIMENTO, JE; SILVA, MHG; RUBENS, CJ. Effects of budesonide and probiotics enemas on the colonic mucosa of rats with experimental colitis. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 22, n. 1, Feb. 2007.

SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, HAUER-JENSEN M, BEKELE BN, RADER-DURLACHER J, DONNELLY JP, RUBENSTEIN EB. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, 100(9):1995-2025, 2004.

SONIS T. & VILLA A. Mucositis: pathobiology and management. **Curr Opin Oncol.** 2015 May;27(3):159-64. doi: 10.1097/CCO.000000000000180.

SONODA, Y.; KASAHARA, T.; YAMAGUCHI, Y.; KUNO, K.; MATSUSHIMA, K.; MUKAIDA, N. Stimulation of interleukin-8 production by okadaic acid and vanadate in a human promyelocyte cell line, an HL-60 subline. Possible role of mitogen-activated protein kinase on the okadaic acid-induced NF-kappaB activation. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 15366-15372, 1997.

STRÄTER N, SCHNAPPAUF G, BRAUS G, LIPSCOMB WN. Mechanisms of catalysis and allosteric regulation of yeast chorismate mutase from crystal structures. **Structure**. 1997 Nov 15;5(11):1437-52.

STRINGER AM, GIBSON RJ, BOWEN JM, LOGAN ASHTON K, YEOH ASJ, AL-DASOOQUI N, KEEFE DMK. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Int J Exp Path**, 90: 489-499, 2009a.

STRINGER AM, GIBSON RJ, BOWEN JM, KEEFE DMK. Chemotherapy-induced modifications to gastrointestinal microbiota: evidence and implications of change. **Curr Drug Metab**, 10:79-83, 2009b.

SUMAN A, NAIDU MU, RAMANA GV, RANI PU, MOHAN IK, ROY P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. **Neoplasia**. 2004 Sep-Oct;6(5):423-31. Review.

SUKHOTNIK I, POLLAK Y, CORAN AG, PILATOV J, BEJAR J, MOGILNER JG, BERKOWITZ D. Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. **Nutr Metab (Lond)**. 2014 Apr 17;11:17. doi: 10.1186/1743-7075-11-17. eCollection 2014.

SUN Q, LIU Q, ZHENG Y AND CAO X. Rapamycin suppresses TLR4-triggered IL-6 and PGE (2) production of colon cancer cells by inhibiting TLR4 expression and NF-kappaB activation. **Mol. Immunol**. (2008) 45: 2929-36.

SZAJEWSKA H, MRUKOWICZ J. Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. **Aliment Pharmacol Ther.**; 22: 365-372; 2007.

TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol**, 21: 335-76, 2003.

TAKEUCHI O, TAKEDA K, HOSHINO K, ADACHI O, OGAWA T, AKIRA S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. **International Immunology**, 12(1):113-7, 2000.

TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, 140(6):805-20, 2010.

TING-TING LI, SHUJI OGINO, ZHI RONG QIAN. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. **World J Gastroenterol** 2014 December 21; 20(47): 17699-17708. ISSN 1007-9327 (print) ISSN 2219-2840 (online)

THOMAS KE, SAPONE A, FASANO A, VOGEL SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. **J Immunol**, 176: 2512-2521, 2006.

TRAVES SL, SMITH SJ, BARNES PJ, DONNELLY LE. Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. **J Leukoc Biol.**;76:441-50; 2004.

TROPPMAIR J, BRUDER JT, MUNOZ H, LLOYD PA, KYRIAKIS J, BANERJEE P, AVRUCH JAND RAPP UR: Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. **JBiol Chem** 269: 7030-7035, 1994.

TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. **Using probiotics and prebiotics to improve gut health.** Drug Discovery Today, Haywards Heath, v.8, n.15, p.692-700, 2003.

TRANTAFILOU, M.; TRANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 301-304, 2002.

UEMATSU S, JANG MH, CHEVRIER N, GUO Z, KUMAGAI Y, YAMAMOTO M, KATO H, SOUGAWA N, MATSUI H, KUWATA H, HEMMI H, COBAN C, KAWAI T, ISHII KJ, TAKEUCHI O, MIYASAKA M, TAKEDA K, AKIRA S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. **Nat Immunol**, 7: 868-874, 2006.

UEMATSU S, AKIRA S. Toll-like Receptors and Type I Inteférons. **J. Biol. Chem.**, 282: 15319-15323, 2007.

UTSUNOMIYA, I., ITO, M. AND OH-ISHI, S. (1998) Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. **Cytokine** 10, 956-963

VAN DER WAAIJ, D. Bioregulation of the digestive tract microflora. **Rev. Sci. Techn. Off. Inter. Epizoot.**, v. 8, p. 333-345, 1989.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. Probiotics in animal nutrition: a review. **Archives of Animal Nutriton-Archiv fur Tiereenahrung.** v. 40, p. 543-567, 1990.

VILLARRUEL G, RUBIO DM, LOPEZ F, et al. *Saccharomyces boulardii* in acute childhood diarrhoea: a randomized, placebo-controlled study. **Acta Pediatr**, 96:538-541; 2007.

VILLAR-GARCÍA J, HERNÁNDEZ JJ, GÜERRI-FERNÁNDEZ R, GONZÁLEZ A, LERMA E, GUELAR A, SAENZ D, SORLÍ L, MONTERO M, HORCAJADA JP, KNOBEL FREUD H. Effect of probiotics (*Saccharomyces boulardii*) on microbial translocation and inflammation in HIV-treated patients: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **J Acquir Immune Defic Syndr.** 2015 Mar 1;68(3):256-63. doi: 10.1097/QAI.0000000000000468.

WAETZIG, G.H.; SCHREIBER, S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 17-32, 2003.

WATANABE S, SUEMARU K, TAKECHI K, KAJI H, IMAI K, ARAKI H. Oral mucosal adhesive films containing royal jelly accelerate recovery from 5-Fluorouracil-induced oral mucositis. **J Pharmacol Sci** 2013;121:110-8.

WEHNER DE, SUTTON L. An interactive, hospital-based injury prevention program for first-, second-, and third-grade students. **J Emerg Nurs.** 2005 Aug;31(4):383-6. No abstract available.

WILSON AJ, GIBSON PR. Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro. *Gastroenterology.* 1997 Aug;113(2):487-96.

WILLIAMS DA. Inflammatory cytokines and mucosal injury. **J Natl Cancer Inst Monogr** 29:26–30; 2001.

WONG DV, LIMA-JÚNIOR RC, CARVALHO CB, BORGES VF, WANDERLEY CW, BEM AX, LEITE CA, TEIXEIRA MA, BATISTA GL, SILVA RL, CUNHA TM, BRITO GA, ALMEIDA PR, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS One.** 2015 Oct 6;10(10):e0139985. doi: 10.1371/journal.pone.0139985. eCollection 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer.** 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 19 fev. 2013.

WU X, KS BA VALLANCE, L BOYER, BERGSTROM, J WALKER, MADSEN K, JR O'KUSKY, BUCHAN AM, K. JACOBSON. *Saccharomyces boulardii* ameliorates *Citrobacter rodentium*-induced colitis through actions on bacterial virulence factors. **Div. of Gastroenterology**, BC Children's Hospital, 4480 Oak St., Rm. K4-181, Vancouver, BC, Canada V6H 3V4. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*;294(1):G295-306; 2008.

WU ZQ, HAN XD, WANG Y, et al. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemother Pharmacol** 68:87-96, 2011.

YAM, K.K., POULIOT, P., N'DIAYE M, M., FOURNIER, S., OLIVIER, M. AND COUSINEAU, B. (2008) Innate inflammatory responses to the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. **Vaccine** 26, 2689–2699

YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, HOSHINO K, KAISHO T, SANJO H, *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, 301(5633):640-3, 2003.

YAN, S. R.; JOSEPH, R. R.; WANG, J.; STADNYK, A. W. Differential Pattern of Inflammatory Molecule Regulation in Intestinal Epithelial Cells Stimulated with IL-1. **J. Immunol.**, v. 177, p. 5604–5611, 2006.

YANG, S.K.; ECKMANN, L.; PANJA, A.; KAGNOFF, M.F. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1214-1223, 1997.

YANG SY, MIAH A, SALES KM, FULLER B, SEIFALIAN AM, WINSLET M. Inhibition of the p38 MAPK pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment. **Int J Oncol.** 2011 Jun;38(6):1695-702. doi: 10.3892/ijo.2011.982. Epub 2011 Mar 21.

ZINGARELLI, B.; SHEEHAN, M.; WONG, H.R. Nuclear factor-kB as a therapeutic target in critical care medicine. **Crit. Care Med.**, v. 31, p. S105-S111, 2003.

ZINGARELLI, B. Nuclear factor-kB. **Crit. Care Med.**, v. 33, p. S414-S416, 2005.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, p. 121-127, 2000.