



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

FRANCISCO RONALDO FARIAS LIMA

***Bacillus clausii* ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA
2018

FRANCISCO RONALDO FARIAS LIMA

***Bacillus clausii* ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

FORTALEZA

2018

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)

- L698b Lima, Francisco Ronaldo Farias.
Bacillus clausii ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL
EM CAMUNDONGOS / Francisco Ronaldo Farias Lima. – 2018.
104 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.
1. Probiótico. 2. Mucosite. 3. 5-Fluorouracil. 4. Bacillus clausii. 5. Quimioterapia. . I.
Título.

CDD 615.1

FRANCISCO RONALDO FARIAS LIMA

***Bacillus clausii* ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

Aprovada em: 02/03/2017

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^o. Dr. Marcelo de Carvalho Figueiras
Universidade Federal do Piauí-UFPI

Prof^o. Dr. Emmanuel Prata de Souza
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dra. Priscilla Fernanda Campos Justino
Faculdades Devry-Unifanor

Prof^a. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dedico este trabalho a Deus, minha rocha e fortaleza!

Aos meus pais, minha filha, minha companheira

e meus irmãos e irmãs, pelo amor e fé,

ao longo desse tempo distante,

na construção da Tese.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus de toda criação, Aquele que me dá força, rocha firme em quem me apoio; luz em meus caminhos, certeza da vitória em todas as batalhas. Obrigado Senhor tu és o meu Deus.

À minha família, meus pais **Lourival Cavalcante Lima** e **Maria Cremilda Farias Lima** pelo zelo, carinho e respeito. Obrigado por me ensinarem que nossos sonhos podem ser possíveis quando acreditamos neles!

Meus irmãos **Rogério**, **Raimundo** e irmãs **Rosimeire**, **Roseni** e **Rosângela** pela confiança. Exemplos em quem me espelho.

À **Maria Luiza do Nascimento Farias** minha filha, por quem luto sempre, luz dos meus dias.

Ao Prof. Dr. **Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira** (*in memoriam*), exemplo de educador em minha graduação. Sempre uma palavra de siga adiante.

Ao meu Orientador, Dr. **Pedro Marcos Gomes Soares**, por ter me acolhido com tanto carinho, pelo incentivo, pela paciência, por acreditar em mim enquanto tantos fecharam as portas, pela virtude de ensinar com amor e pela compreensão de que nos erros encontramos uma oportunidade de aprendizado.

Ao professor Dr **Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza**, pelos conselhos e a disposição em sempre ouvir e por também ajudar financeiramente nessa pesquisa.

Aos meus amigos e companheiros de experimentos **Tiago Santos**, **Marcos Aurélio** e **Renan Oliveira** que foram grandes companheiros de bancada e sem os quais jamais teria conseguido realizar essa pesquisa. Muito obrigado pela amizade, pela paciência, pela teimosia e perseverança, pela parceria e disponibilidade em ajudar nos experimentos. Estar junto a vocês foi uma fortaleza, uma equipe louvável e certeza de vitória.

Às minhas amigas **Kaira**, **Deysen**, **Patrícia**, **Fabricia**, **Cecília**, **Priscila**, **Samara** e **Mariele** que sempre me acolheram muito bem na chegada ao Laboratório e que sempre foram solícitas em ajudar seja em conselhos (mesmo que muitas vezes fossem um puxão de orelha de alerta) nos experimentos ou na vida. Sou grato a cada uma pelos ensinamentos tanto em pesquisa quanto na vida.

Aos amigos **Athayde, Carlos Eduardo, Jonathan e Álvaro** que sempre foram solícitos em ajudar e pela sua amizade sincera. Não havia tempo ruim para estes amigos e sou muito grato a todo tempo que dispuseram para ajudar em meus experimentos e análises.

Aos pós-graduandos e às técnicas de morfologia da UFC, em especial a Socorro, quem sempre atendeu as minhas solicitações para confecção de lâminas de histologia, muito obrigado, sou verdadeiramente grato.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, **Laura e Célia**, pela paciência e colaboração nas questões burocráticas.

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia** pelos ensinamentos transmitidos, pela inspiração e pela capacidade de dialogar todas as vezes que os procurei. Meu muito obrigado.

Aos **professores que compuseram a banca de avaliação da Tese de Doutorado em Farmacologia** pelos ensinamentos transmitidos, pelas observações e contribuição para a melhoria deste trabalho. Meu muito obrigado.

À CAPES pela bolsa concedida a mim e que me possibilitou à busca do Doutorado, pois sem isso seria impossível.

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

**O SENHOR é a minha luz, a minha salvação;
a quem temerei?**

**O SENHOR é a força da minha vida;
de quem me recearei?**

Sl. 27,1

RESUMO

Introdução: 5-Fluorouracil é um antimetabólito comumente prescrito no tratamento do câncer, e seu uso em tecidos altamente proliferativos trazem problemas significativos como a mucosite. *Bacillus clausii* (*B. clausii*) é um probiótico baciliforme comumente usado na proteção contra diarreia aguda e distúrbios gastrintestinais associados à disbiose gastrintestinal. **Objetivos:** Avaliar os efeitos do probiótico *B. clausii* sobre a inflamação e as alterações gastrintestinais no curso da mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU. **Métodos:** Camundongos machos Swiss (25-30g) foram tratados com 5-FU (450 mg/kg, i.p.) (5-FU e *B. clausii* + 5-FU) ou solução salina (salina, *B. clausii*). *B. clausii* foi administrado por gavagem em volume correspondente a (1×10^9 UFC) durante 3 dias após a administração de 5-FU, sendo realizada durante esse tempo, análise de alterações ponderais. Após 3 dias, os animais foram sacrificados e amostras do duodeno, jejuno e íleo foram obtidas para avaliação da histomorfometria e histopatologia, atividade de MPO, níveis de MDA e GSH. Amostras de sangue foram retiradas para a contagem total de leucócitos. Em outros grupos de animais foram avaliados o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal, a permeabilidade intestinal, a contratilidade do músculo liso intestinal, a resistência elétrica transepitelial (TEER) e o transporte intestinal de água e eletrólitos. A resposta mecânica foi avaliada utilizando-se um transdutor de força isométrico acoplado a um sistema de aquisição de dados. Carbacol (10^{-10} - 10^{-4} M) foi aplicado sobre músculo liso do jejuno e do íleo. A permeabilidade e a TEER foram aferidas em câmaras de Ussing. **Resultados:** O tratamento com *B. clausii* atenuou a lesão da mucosa, revertendo a diminuição da relação vilo/cripta e do peso corporal. Diminuiu a infiltração de neutrófilos, os níveis de MDA, o consumo de GSH, a retenção gástrica, a secreção de água e eletrólitos, a hipercontratilidade intestinal e o aumento da permeabilidade intestinal induzida por 5-FU. No entanto, o tratamento com 5-FU apresentou aumento dos valores de TEER e *B. clausii* não foi capaz de diminuir esses valores. **Conclusão:** A administração de *B. clausii* pode ser uma nova abordagem terapêutica para a mucosite intestinal, pois, esse probiótico foi capaz de atenuar a mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.

Palavras-chave: Probiótico, Mucosite, 5-Fluorouracil, *Bacillus clausii*, Quimioterapia.

ABSTRACT

***Bacillus clausii* ATTENUATES 5-FLUOROURACIL-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE**

Background 5-Fluorouracil is an antimetabolite commonly prescribed in the treatment of cancer, and its use in highly proliferative tissues brings significant problems such as mucositis. *Bacillus clausii* (*B. clausii*) is a bacillary probiotic commonly used in protection against acute diarrhoea and gastrointestinal disorders associated with gastrointestinal dysbiosis. **Objectives:** To evaluate the effects of probiotic *B. clausii* on inflammation and gastrointestinal changes 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.) (5-FU and *B. clausii* + 5-FU) or saline solution (saline, *B. clausii*). *B. clausii* was administered by gavage in volume corresponding to (1×10^9 CFU) for 3 days after administration of 5-FU, during which time, analysis of weight changes was performed. After 3 days, the animals were sacrificed and samples of duodenum, jejunum and ileum were obtained for evaluation of histomorphometry and histopathology, MPO activity, MDA and GSH levels. Blood samples were taken for the total white blood cell count. In other groups of animals, gastric emptying and intestinal transit, intestinal permeability, intestinal smooth muscle contractility, transepithelial electrical resistance (TEER) and intestinal transport of water and electrolytes were evaluated. The mechanical response was assessed using an isometric force transducer coupled to a data acquisition system. Carbacol (10^{-10} - 10^{-4} M) was applied on smooth muscle of jejunum and ileum. Permeability and TEER were measured in Ussing chambers. **Results:** Treatment with *B. clausii* attenuated mucosal injury, reversing the decrease in villus/crypt ratio and body weight. Also, decreased neutrophil infiltration, MDA levels, GSH consumption, gastric retention, water and electrolyte secretion, intestinal hypercontractility, and increased 5-FU-induced intestinal permeability. However, treatment with 5-FU showed increased TEER and *B. clausii* was not able to decrease these values. **Conclusion:** The administration of *B. clausii* may be a new therapeutic approach for intestinal mucositis because this probiotic was able to attenuate 5-FU induced intestinal mucositis in mice.

Key words: Probiotic, Mucositis, 5-Fluorouracil, *Bacillus clausii*, Chemotherapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

5'-AMP	5'-Monofosfato de adenosina cíclico
5-FU	5-Fluorouracil
5-HT	5-hidroxitriptamina
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATV	Atorvastatina
B. clausii	<i>Bacillus clausii</i>
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CCR	Câncer Colorretal
CH ₂ THF	5,10-metileno tetraidrofolato
COX-2	Ciclooxygenase-2
CPT-11	Cloridrato de irinotecano
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
DAB	3,3'diaminobenzidine-peróxido
DHFU	Diidrofluorouracil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dntp	Deoxinucleotídeos
DPD	diidropirimidina desidrogenase
dTMP	deoxitimidina monofosfato
dUMP	deoxiuridina monofosfato
dUTP	deoxiuridina trifosfato
EPM	Erro padrão da média
FAO	Food and Agriculture Organization
FdUMP	monofosfato de fluordeoxiuridina
FdUTP	trifosfato de fluordeoxiuridina
FUDR	Fluordeoxiuridina
FUMP	monofosfato de fluoruridina
FUDP	difosfato de fluoruridina

FUTP	Trifosfato de fluoruridina
GSH	Glutathiona reduzida
HTAB	Hexadecitrimetilamônio
IFN-	Interferon-
i.p	Intraperitoneal
IL-	Interleucina
ILRa	Antagonista do receptor de IL-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ISOO	Sociedade Internacional De Oncologia Oral
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LEFFAG	Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrintestinal
Treg	Linfócitos T Reguladores
LPS	Lipopolissacarídeo
MASCC	Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer
MDA	Malonaldeído
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MPO	Mieloperoxidase
MTX	Metotrexato
NCI	National Cancer Institute
NFkB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico Sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva
NOSi	Óxido nítrico sintase induzida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator Ativador Plaquetário
PG	Prostaglandina
QT	Quimioterapia
RNA	Ácido Ribonucléico

ROS	Espécies reativas de oxigênio
SP	Substância P
TGF-	Fator de crescimento transformador
TGI	Trato Gastrintestinal
TNBS	2,4,6 – trinitrobenzenoasulfônico
TNF-	Fator de necrose tumoral
TP	Timidina Fosforilase
TS	Timidilato Sintase
UFC	Unidade Formadora de Colônia
V.F	Vermelho de Fenol

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	20
FIGURA 02	Estrutura química do 5-FU e da uracila.....	25
FIGURA 03	Metabolismo hepático do 5-FU.....	26
FIGURA 04	Mecanismo de ação do 5-FU sobre a timidilato sintase	27
FIGURA 05	Representação da Estrutura intestinal animal.....	29
FIGURA 06	Fases da mucosite intestinal.....	31
FIGURA 07	Distribuição espacial e composição da microbiota ao longo do Trato Gastrointestinal.....	38
FIGURA 08	Representação esquemática da indução da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.....	48
FIGURA 09	Modelo de avaliação da resposta contráctil.....	53
FIGURA 10	Curva Ponderal (%) em camundongos tratados com <i>Bacillus clausii</i> na Mucosite Intestinal Induzida por 5-FU.....	54
FIGURA 11	Contagem Total e Diferencial de leucócitos em camundongos tratados com com <i>B clausii</i> na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	60
FIGURA 12	Escores histopatológicos em camundongos tratados com <i>B. clausii</i> na mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	61
FIGURA 13	Fomomicrografias de duodeno, jejuno e íleo de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU e tratados com <i>B. clausii</i>	62
FIGURA 14	Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU e tratados com <i>B. clausii</i>	64
FIGURA 15	Efeito do <i>B. clausii</i> sobre o infiltrado neutrofílico no curso da mucosite intestinal induzida por 5- FU em camundongos.....	65
FIGURA 16	Efeito do <i>B. clausii</i> sobre a concentração de GSH nos segmentos intestinais no curso da mucosite intestinal induzida por 5- FU em camundongos.....	66

FIGURA 17	Efeito do <i>B. clausii</i> sobre a concentração de MDA nos segmentos intestinais no curso da mucosite intestinal induzida por 5- FU em camundongos.....	67
FIGURA 18	Efeito do <i>B. clausii</i> sobre o esvaziamento gástrico e o trânsito gastrintestinal no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.....	68
FIGURA 19	Efeito do <i>B. clausii</i> sobre o transporte intestinal de água e eletrólitos no curso da mucosite intestinal induzida por 5- FU em camundongos.....	69
FIGURA 20	Efeito do <i>B. clausii</i> sobre a contratilidade jejunal e ileal no curso da mucosite intestinal induzida por 5- FU em camundongos.....	72
FIGURA 21	Efeito do <i>B. clausii</i> sobre a permeabilidade ileal de no curso da mucosite intestinal induzida por 5- FU em camundongos.....	73
FIGURA 22	Resistência Elétrica Transepitelial (TEER) em camundongos tratados com <i>B.clausii</i> ou 5-FU.....	74
FIGURA 23	Modelo hipotético dos possíveis mecanismos de ação do probiotico <i>Bacillus clausii</i> na proteção contra a mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 01	Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.....	21
TABELA 02	Classes de fármacos utilizados na terapia do câncer com respectivos mecanismos de ação e exemplares típicos.....	22
TABELA 03	Sistema de escores histopatológicos.....	50

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1.	O câncer: caracterização, incidência, tratamento e suas repercussões....	19
2.2.	Quimioterapia.....	23
2.3.	5-Fluorouracil: mecanismo de ação, metabolismo e repercussões em pacientes oncológicos.....	24
2.4.	Mucosite por antineoplásicos.....	27
2.4.1.	Mucosite Intestinal.....	28
2.4.2.	Possíveis alvos terapêuticos na mucosite intestinal.....	34
2.5.	Microbiota intestinal, probióticos e <i>Bacillus clausii</i>	36
2.6.	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer–LAFICA e Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinal-LEFFAG e sua contribuição para a compreensão da Mucosite Intestinal.....	41
3.	JUSTIFICATIVA.....	45
4.	OBJETIVOS DO PROJETO.....	46
4.1	Objetivo Geral.....	46
4.2	Objetivos Específicos.....	47
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.1	Animais.....	47
5.2	Indução da mucosite e tratamento com <i>B. clausii</i>	47
5.3	Parâmetros avaliados na mucosite gastrointestinal.....	49
5.3.1	Curva Ponderal.....	49
5.3.2	Contagem de leucócitos no sangue.....	49
5.3.3	Análise histopatológica na mucosite gastrointestinal.....	49
5.3.4	Ensaio para mieloperoxidase.....	51
5.3.5	Análise do Malonaldeído.....	51
5.3.6	Ensaio para Glutathiona.....	52
5.3.7	Medidas de contratilidade com fármacos.....	52
5.3.8	Modelo de estimulação elétrica.....	53
5.3.9	Avaliação do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal.....	54

5.3.10	Avaliação do transporte ileal de água e eletrólitos.....	55
5.3.11	Avaliação da Permeabilidade Intestinal.....	56
5.3.12	Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER).....	57
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
7.	RESULTADOS.....	58
7.1	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre a perda de peso induzida por 5-FU em camundongos Swiss.....	58
7.2	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre a leucopenia induzida por 5-FU em camundongos Swiss.....	59
7.3	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre os parâmetros de Histologia e Morfometria Intestinal.....	60
7.4	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre a atividade de MPO, ensaio de Glutaciona e concentrações de Malonaldeído.....	65
7.5	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre o Esvaziamento gástrico e Trânsito intestinal.....	67
7.6	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre o Transporte intestinal de água e eletrólitos e contratilidade intestinal.....	69
7.7	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre a permeabilidade intestinal	73
7.8	Efeito do tratamento com <i>B. clausii</i> sobre a resistência elétrica trans-epitelial.....	74
8.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	75
9.	CONCLUSÃO.....	86
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

Câncer ou neoplasia maligna é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo sendo causado por um mau funcionamento dos mecanismos bioquímicos de sinalização que dirigem o ciclo celular (LEVITZKI e KLEIN, 2010, INCA-2018). O diagnóstico de câncer modifica o estilo de vida. Além de desconforto e dor, que comprometem a capacidade laboral, há também perda de auto-estima e modificações de ordem social. O câncer é atualmente o segundo maior causador de morte no mundo (PAIVA, 2006; BRANDÃO *et al.*, 2010; INCA-MS, 2018).

Uma das estratégias utilizadas no combate ao câncer é a terapia antineoplásica, utilizada tanto no tratamento de tumores não curáveis por operação ou radioterapia, como também de forma isolada para alguns tipos de neoplasia (AL SAFARJALANI *et al.*, 2006). Assim, entre os fármacos utilizados pode-se citar o 5-Fluorouracil (5-FU) que é um antimetábólico eficiente no controle das células neoplásicas e foi desenvolvido na década de 50 do século XX com a função de inibir moléculas de DNA e/ou RNA, impedindo a síntese e metabolismo de novas células. Contudo, este fármaco possui citotoxicidade inespecífica, lesando tanto as células neoplásicas, quanto as células normais, provocando efeitos colaterais. Dentre os efeitos colaterais, destaca-se a mucosite intestinal que afeta a maioria dos pacientes que fazem uso do fármaco (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A mucosite intestinal pode representar, ainda, aumento dos custos hospitalares, atingindo o triplo dos valores habituais (LALLA *et al.*, 2006; TOOLEY; HOWARTH; BUTLER, 2009). Sendo assim, é evidente a necessidade de se estudar formas que possam minimizar o impacto da mucosite em pacientes com câncer.

Como demonstrado, a terapia anticâncer com o uso de antineoplásicos, tais como o 5-FU, traz repercussões gastrintestinais adversas, como a mucosite. No intuito de investigar alternativas de controle da mucosite induzida por 5-FU nosso grupo tem demonstrado expertise com o uso de probióticos e Justino *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento com o próbio *Saccharomyces boulardii* foi capaz de reverter de forma significativa às alterações da mucosite intestinal causadas pelo 5-FU em camundongos, mostrando que essa alternativa terapêutica pode contribuir

para amenizar os efeitos colaterais da mucosite intestinal advinda do tratamento com antineoplásicos (JUSTINO *et al.*, 2015).

Diante dessa perspectiva buscou-se, no presente estudo, investigar o conjugado de quatro cepas de *B. clausii*, comercialmente conhecido como Enterogermina®. A atividade de *B. clausii* tem sido descrita na prevenção e tratamento da diarreia aguda e infecções intestinais, proteção contra efeitos gastrintestinais secundários devido à antibioticoterapia, atividade imunomoduladora. Apesar de seu efeito comprovado em doenças que acometem o TGI sua ação probiótica frente à mucosite intestinal causada por 5-FU não foi investigada. Sendo assim, resolvemos investigar se o tratamento com *B. clausii* pode exercer efeitos protetores durante a inflamação e disfunção gastrintestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O câncer: caracterização, incidência, tratamento e suas repercursões



O termo câncer é utilizado para definir um conjunto de doenças complexas e potencialmente letais que compartilham uma característica fundamental: a proliferação celular anormal descontrolada e a capacidade de invadir tecidos adjacentes (MUKHERJEE, 2012; WHO, 2015; BRASIL, 2018). Essa enfermidade se caracteriza como 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. Em 2017 o câncer foi mundialmente a principal causa de morte, sendo responsável por 8,8 milhões de óbitos, representando aproximadamente 14,1% de todas as mortes no mundo (WHO, 2018).

Estima-se, para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma

(cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. Os cânceres de próstata (68 mil) em homens e mama (60 mil) em mulheres serão os mais frequentes. Na figura 01 evidencia-se que à exceção do câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais incidentes em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%). Nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figurarão entre os principais (INCA, 2018).

FIGURA 01 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%
			Mulheres				

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2018

As estimativas para o estado do Ceará e para Fortaleza das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de novos casos de câncer, segundo o sexo e localização primária demonstram que os quatro tipos de cânceres mais incidentes em homens são: próstata, estômago, cólon e reto. Nas mulheres são: mama, cólo de útero estômago e cólon e reto (Tabela 01).

Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro comumente diagnosticado em homens e o segundo, em mulheres sendo responsável por cerca de 8% das mortes relacionadas ao câncer (FERLAY *et al.*, 2011). No Brasil, o câncer

colorretal representa o terceiro tipo mais incidente, tanto em homens como em mulheres (INCA, 20018).

TABELA 01: Estimativas para o estado do Ceará e Fortaleza para o ano de 2018 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária*.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	2.730	61,43	60,01	560	45,59	54,81	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	2.200	47,52	48,17	1.410	100,36	58,48
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	990	21,24	19,98	290	20,81	18,60
Traqueia, Brônquio e Pulmão	600	13,42	15,14	220	17,65	20,43	540	11,58	11,61	220	15,60	15,92
Cólon e Reto	440	9,84	10,45	190	15,81	18,32	500	10,79	9,70	240	17,39	14,99
Estômago	800	18,11	17,44	160	12,80	11,71	520	11,13	10,14	140	10,01	6,07
Cavidade Oral	290	6,55	7,97	100	7,86	10,15	190	4,06	3,59	40	2,94	2,60
Laringe	310	6,98	7,69	110	9,29	10,95	50	1,14	1,06	20	1,21	1,18
Bexiga	130	2,85	2,86	50	4,16	4,92	80	1,72	1,45	30	2,28	1,99
Esôfago	320	7,20	8,10	80	6,09	7,44	160	3,41	3,27	30	2,26	2,06
Ovário	-	-	-	-	-	-	280	5,95	5,75	130	8,93	7,47
Linfoma de Hodgkin	70	1,68	1,56	30	2,34	2,22	40	0,77	0,63	20	1,22	1,10
Linfoma não Hodgkin	180	4,02	4,17	60	5,10	5,55	150	3,27	2,96	60	4,04	3,34
Glândula Tireoide	120	2,70	2,08	30	2,79	2,41	490	10,64	6,58	150	10,64	7,64
Sistema Nervoso Central	240	5,36	5,98	80	6,75	8,15	200	4,35	4,36	80	5,67	5,72
Leucemias	260	5,81	5,73	80	6,34	6,75	200	4,21	3,55	50	4,43	4,08
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	240	5,09	4,81	110	7,79	7,53
Pele Melanoma	70	1,66	1,55	30	2,03	2,24	70	1,61	1,42	30	2,23	1,94
Outras Localizações	1.640	36,92	40,41	460	37,67	39,28	1.630	35,25	33,74	420	29,67	26,66
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	8.200	184,77	188,78	2.240	181,73	203,42	8.530	183,93	178,96	3.470	247,78	179,06
Pele não Melanoma	3.130	70,45	-	610	49,73	-	2.890	62,22	-	470	33,54	-
Todas as Neoplasias	11.330	255,29	-	2.850	231,22	-	11.420	246,24	-	3.940	281,34	-

¹População padrão mundial (1960). / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2018

O tratamento contra o câncer ou neoplasia maligna é um desafio constante na pesquisa clínica. Embora crescente o número de estudos em torno dessa doença multifatorial é ainda muito difícil o tratamento e a cura dessa enfermidade, pois a mesma compromete as células com perda da estrutura fisiológica resultando em proliferação celular descontrolada, perda de função, poder de invasão e capacidade de disseminação para outras partes do corpo (VERDE, 2007).

O paciente diagnosticado com câncer apresenta diversos aspectos de sua vida alterados apresentando em muitas situações desconforto e dor que comprometem sua capacidade laboral bem como suas atividades rotineiras, comprometendo tanto a vida diária como repercutindo financeiramente e também levar à perda de autoestima e modificações de ordem social (PAIVA, 2006).

A evolução da medicina permitiu o surgimento de uma quantidade significativa de novos fármacos para o tratamento do câncer, aumentando a sobrevida global e qualidade de vida dos pacientes (CALABRESI e CHABNER, 2012; RANG, 2008). Apesar desse avanço, mais de 50% dos pacientes não respondem à terapia inicial, e a doença progride para a doença metastática (CHU, 2005). A Tabela 02 esquematiza as principais classes de drogas utilizadas contra o câncer (antineoplásicos) e seus mecanismos de ação.

TABELA 02: Classes de fármacos utilizadas na terapia do câncer com respectivos mecanismos de ação e exemplares típicos.

CLASSE	NOME	AÇÃO
Alquilantes	Ciclofosfamida e bussulfam	Ligam-se ao DNA impedindo a separação dos dois filamentos na dupla hélice espiralar.
Antimetabólicos	5-Fluoruracil e metotrexato	Inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e do RNA
Antibióticos	Bleomicina e adriamicina	Interagem com o DNA, inibindo a síntese deste ácido ou de proteínas
Inibidores Mitóticos	Vincristina e vimblastina	Sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos
Outros Agentes	Procarbazina e L-asparaginase	Não determinada ou não esclarecida

2.2. Quimioterapia

Como pode ser observado na tabela 02, uma das estratégias utilizadas no combate ao câncer é a terapia antineoplásica com quimioterápicos, utilizada tanto no tratamento de tumores não curáveis por operação ou radioterapia, como também de forma isolada para alguns tipos de neoplasia. Essa terapia também é utilizada naqueles casos em que se deseja reduzir a dimensão e a agressividade de cirurgias oncológicas através de um tratamento pré-operatório (quimioterapia neo-adjuvante) (INCA 2018).

Embora o grande avanço na terapêutica alcançado nos últimos anos tenha possibilitado um prognóstico melhor em diversos tipos de tumores, os pacientes oncológicos continuam sofrendo bastante com a toxicidade oriunda da quimioterapia e radioterapia. O número limitado do arsenal terapêutico para tratar os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia se dá muito em parte ao escasso conhecimento dos mecanismos patológicos subjacentes à toxicidade do tratamento oncológico (BOSSI, 2015). Dessa forma, os efeitos colaterais conduzem, na maioria das vezes, ao interrompimento do tratamento quimioterápico e radioterápico, levando ao comprometimento da eficácia geral do tratamento oncológico (BOSSI, 2015).

O objetivo primário da quimioterapia (QT), forma mais comum de terapia antineoplásica, é destruir as células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes antineoplásicos atua de forma não específica, lesando tanto as células neoplásicas, quanto às células normais. No momento em que populações celulares normais são comprometidas, surgem os efeitos colaterais tóxicos. Conseqüentemente, estas substâncias podem provocar efeitos tóxicos graves (CALABRESI; CHABNER, 2012), sendo um dos órgãos mais afetados o trato gastrointestinal (TGI) (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999).

Dentre os antineoplásicos aplicados em QT, o 5-Fluorouracil (5-FU) é um dos fármacos mais utilizados, mas sua utilização pode comprometer o tratamento em consequência de suas reações adversas. Este medicamento foi desenvolvido na década de 50 do século XX e mostrou-se promissor por inibir moléculas de DNA e/ou RNA, impedindo a síntese e metabolismo de novas células. No entanto, o tratamento pode apresentar efeitos colaterais, muitas vezes responsáveis por

recusas da terapia, dentre os quais a mucosite intestinal, que afeta a maioria dos pacientes que fazem desse fármaco (SONIS, 2004).

Mielotoxicidade, cistite, toxicidade pulmonar, cardiotoxicidade e mucosite são efeitos adversos mais encontrados após o uso de 5-FU (LEITÃO, 2007; VERDE, 2007).

Diante do que foi exposto observa-se que é importante à compreensão e a correta caracterização das repercussões gastrintestinais em pacientes que fazem uso de antineoplásicos.

2.3. 5-Fluorouracil: mecanismo de ação, metabolismo e repercussões em pacientes oncológicos

O 5-Fluorouracil (5-FU) foi desenvolvido em 1957 e pertence à classe das fluoropirimidinas (HEIDELBERGER *et al.*, 1957). Esse fármaco antimetabólico foi gerado com a finalidade de tratar pacientes com câncer por meio da inibição de processos como a incorporação de moléculas de DNA e/ou RNA, processo essencial para síntese e metabolismo de novas células. (RUTMAN; CANTAROW e PASCHKIS, 1954). 5-FU é administrado por via intravenosa, na forma de *bolus* (administração rápida, em tempo menor ou igual a um minuto) ou como infusão contínua prolongada (tempo superior a 60 minutos, ininterruptamente) durante determinado período. A meia-vida é curta, de dez a vinte minutos, tornando a infusão contínua vantajosa (LIMA, 2004).

O 5-FU é um análogo da uracila que contem um átomo de fluorina na posição C-5 em vez de hidrogênio (figura 02). Ele entra nas células por meio de transporte facilitado, mecanismo semelhante ao da uracila. O 5-FU pode ser convertido em três metabólitos ativos, são eles: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluoruridina (FUTP) (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003).

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 fluordeoxiuridina (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 (Figura 03) (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003).

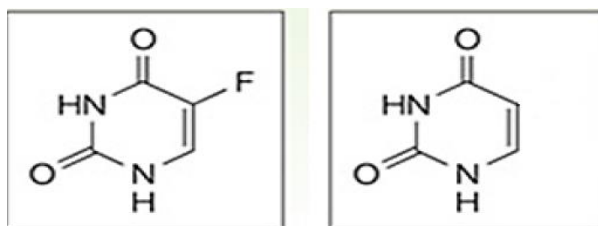


FIGURA 02 - Estrutura química do 5-Fluoruracil e da uracila. Adaptado de LONGLEY *et al.*, 2003.

O metabolismo do 5-FU varia de indivíduo para indivíduo devido à variação genética e à degradação da enzima DPD que é provavelmente a base genética mais importante para a variação da farmacocinética entre indivíduos (SOVERI *et al.*, 2014).

A enzima Timidilato Sintase (TS) catalisa a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) utilizando o 5,10-metileno tetraidrofolato (CH_2THF) como um doador de grupos metil. O metabólito ativo do 5-FU que é o monofosfato de fluordeoxiuridina liga-se no sítio de ligação do nucleotídeo da enzima TS e forma um complexo estável TS e CH_2THF . Esse complexo é capaz de bloquear o acesso de dUMP ao sítio de ligação do nucleotídeo inibindo a síntese de dTMP. Isso resulta em um desequilíbrio nas concentrações de deoxinucleotídeos (dNTP) e também um aumento dos níveis de deoxiuridina trifosfato (dUTP), ambos podem causar destruição do DNA. A extensão ao dano do DNA causado pela dUTP é dependente dos níveis das enzimas pirofosfato dUTPase e uracil-DNA glicosilase (UDG) (LONGLEY, HARKIN e JOHNSTON, 2003; figura 04).

O 5-FU é utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama e o colorretal, sendo de maior impacto nesse último. Os efeitos colaterais do 5-FU variam consideravelmente de acordo com o tratamento, a dose utilizada e a via de administração e são mais evidentes em células com grande

índice de mitose, como tecidos de rápida proliferação. Seus efeitos colaterais incluem mielossupressão, mucosite oral e intestinal, dermatite e diarreia (VANHOECKE *et al.*, 2015). Cerca de 40% dos pacientes tratados com doses padrões de quimioterápicos, como o 5-FU, apresentam mucosite e há relatos de pacientes que a apresentam na primeira dose administrada (GIBSON *et al.*, 2013).

Outros efeitos podem ainda ocorrer, tais como: náuseas, alopecia, toxicidade cardíaca e ocular, faringite, esofagite, gastrite, colite, dermatite (KATZUNG; MASTERS e TREVOR, 2014). Também são relatadas alterações na microflora intestinal, que podem contribuir para a ocorrência da diarreia. O aparecimento da mucosite, seja oral ou intestinal, é um dos principais fatores limitantes da continuidade do tratamento, principalmente em idosos (SAVVA-BORDALO *et al.*, 2010).

Estudo realizado com 880 pacientes da França e 153 da Finlândia com câncer colorretal e em uso de 5-FU evidenciou que a mucosite, a diarreia e as náuseas atingiram respectivamente 42%, 53% e 54% desses pacientes (SOVERI *et al.*, 2014). Esses dados revelam que a mucosite é um das complicações mais prevalentes com o uso do 5-FU.

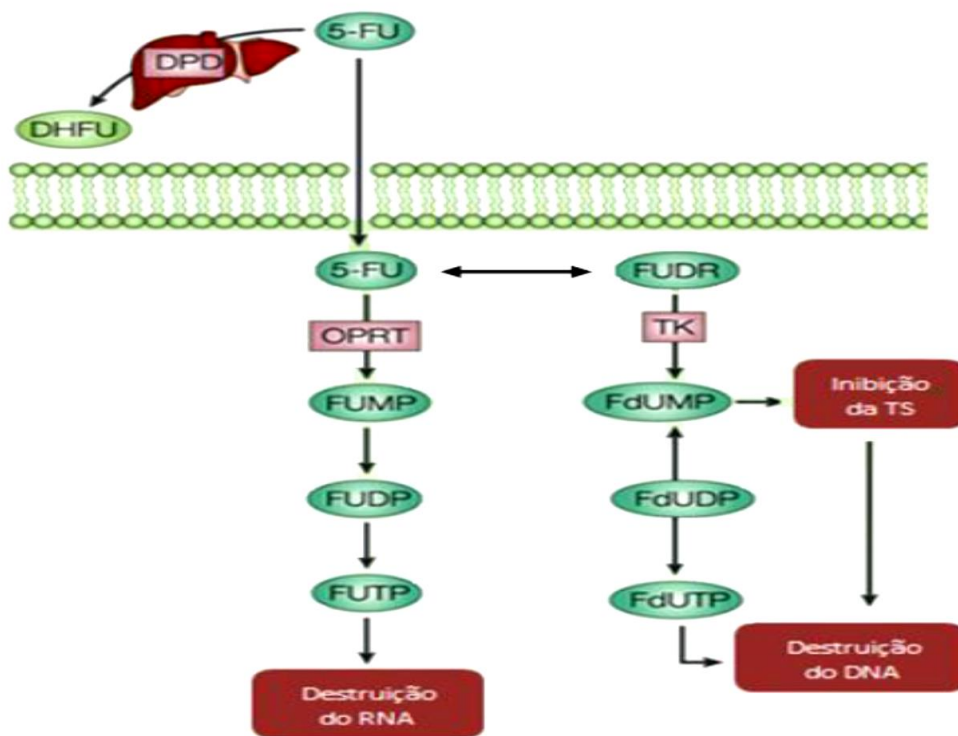


FIGURA 03 - Metabolismo Hepático do 5-FU adaptado de Langley *et al.*, 2003 O 5-Fluorouracil (5-FU) é convertido em três principais metabolitos ativos: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). O principal mecanismo de ativação de 5-FU é a conversão para monofosfato de fluorouridina (FUMP).

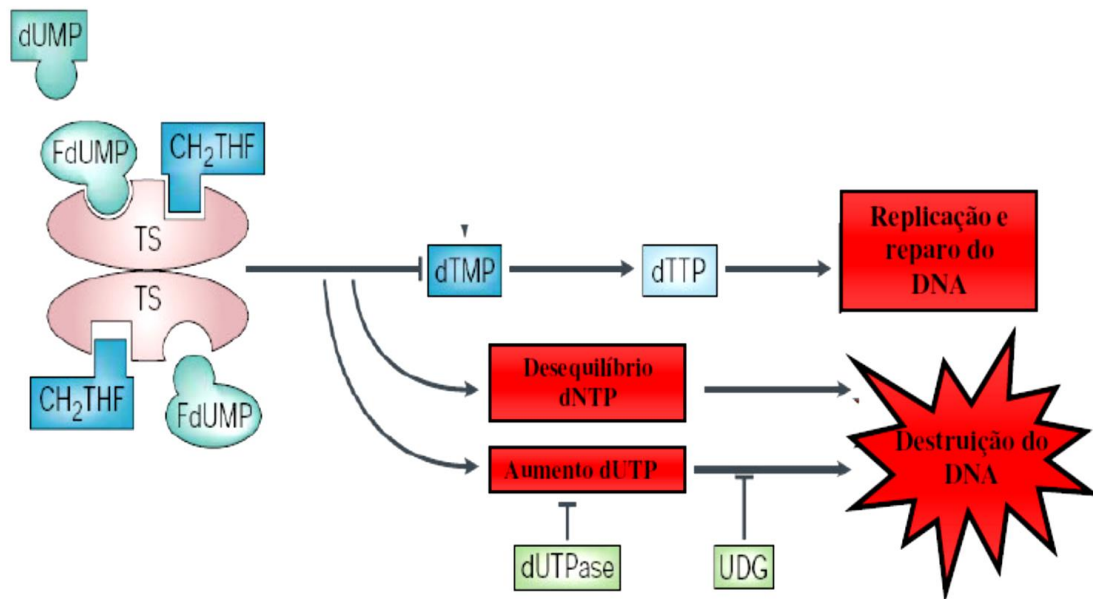


FIGURA 04 - Mecanismo de ação do 5-FU sobre a Timidilato Sintase. Adaptado de Langley *et al*, 2003. A timidilato sintase (TS) catalisa a conversão do monofosfato de desoxiuridina (dUMP) em desoxitimidina monofosfato (dTMP) com 5,10-metileno tetrahydrofolato (CH₂THF) como o doador de metil. O metabolito ativo do 5-FU, monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP) liga-se ao local de ligação do nucleótido na TS e forma um complexo ternário estável com TS e CH₂THF, bloqueando o acesso de dUMP ao local de ligação de nucleótidos e inibindo a síntese de dTMP. Isso resulta em desequilíbrios de pool de desoxinucleótidos (dNTP) e níveis aumentados de trifosfato de desoxiuridina (dUTP), os quais causam danos ao DNA. A extensão do dano do DNA causado pelo dUTP é dependente dos níveis da pirofosfatase dUTPase e uracil-DNA glycosylase (UDG). A dTMP pode ser recuperada da timidina através da ação da timidina quinase (TK).

2.4. Mucosite por antineoplásicos

Mucosite do trato alimentar 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 – mucosite oral – ou mucosa intestinal – mucosite gastrointestinal). 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 gastrointestinal (GIBSON e KEEFE, 2006).

Esses efeitos colaterais são bastante comuns em pacientes portadores de câncer submetidos a tratamento com agentes quimioterápicos diversos, em especial, os antimetabólitos, como por exemplo, o metotrexato e 5-Fluorouracil, mas também

com outros agentes como cisplatina, doxorubicina, ifosfamida, dentre outros. (SOARES *et al.*, 2008).

Qualquer região da mucosa digestiva (desde a boca ao ânus) pode ser afetada. Algumas porções são mais suscetíveis que outras à mucosite de forma precoce ou tardia e, por esta razão, o termo mucosite alimentar, mais abrangente, tem sido considerado o mais adequado para descrever o processo (SONIS, 2004; SCULLY, SONIS e DIZ, 2006).

Embora a maioria das pesquisas tenham se direcionado à mucosite oral, pela facilidade da observação das lesões e dos resultados de tratamentos, a mucosite gastrintestinal destaca-se pelos seus importantes sinais e sintomas tais como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, retarde do trânsito gastrintestinal e hipercontratilidade do músculo liso jejunal e ileal comprometendo o tratamento e sendo causa de abandono de terapia e muitas vezes levando à morte (SOARES, 2008).

De acordo com Hauer-Jensen *et al.* (2004), a mucosite acomete principalmente o intestino delgado. Já em relação ao cólon, Logan *et al.* (2009) evidenciaram alterações mínimas no cólon após administração dos quimioterápicos metotrexato (MTX) ou 5-FU e Ferreira *et al.* (2012) não encontraram alterações no cólon com o uso do 5-FU por via intraperitoneal (i.p.) para indução de mucosite em camundongos (HAUER-JENSEN *et al.*, 2004; LOGAN *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2012).

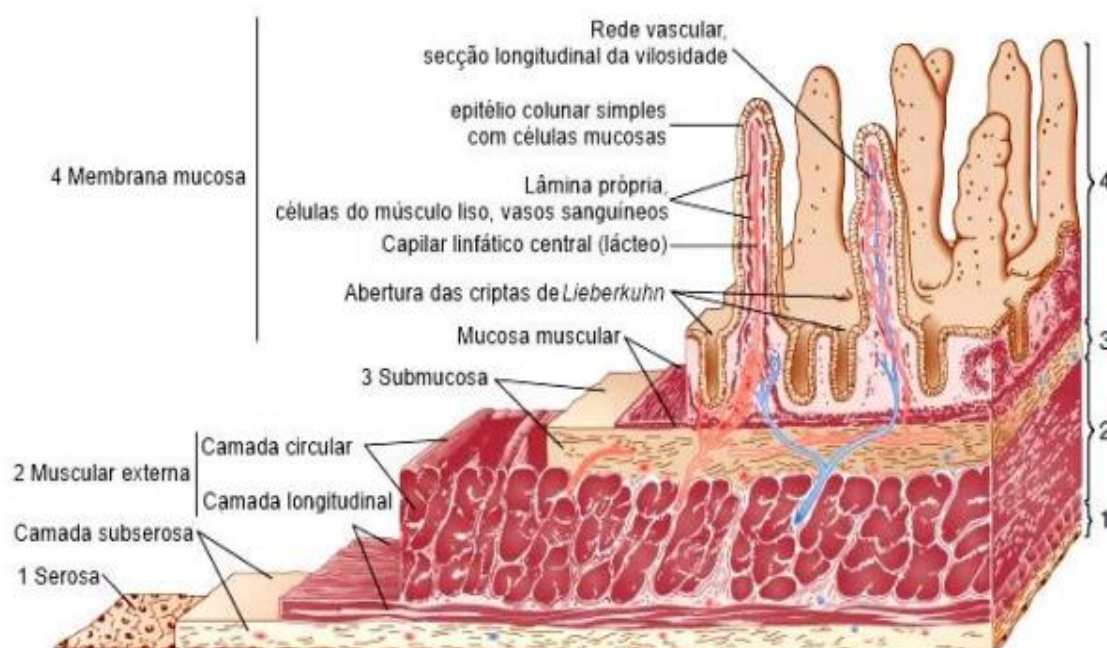
2.4.1. Mucosite intestinal

O intestino é formado por três camadas básicas, a camada epitelial, a lâmina própria e a muscular da mucosa. O uso de quimioterápicos pode levar a falhas na divisão celular e na renovação epitelial, isso ocasiona perda rápida da estrutura e função do intestino (DUNCAN e GRANT, 2003).

O intestino é um local muito suscetível às lesões ocasionadas por drogas anticâncer por causa da rápida taxa de “*turnover*” do epitélio de cerca de 3-4 dias (BOWEN *et al.*, 2006). O epitélio intestinal é composto por uma camada simples de células epiteliais cilíndricas que separam toxinas de antígenos bacterianos (altamente concentrados no lúmen intestinal) dos tecidos linfoides associados ao trato intestinal (KAGNOFF & ECKMANN, 1997). O conjunto formado por epitélio

mais tecido conjuntivo forma a mucosa intestinal. Dessa maneira, essa superfície representa uma importante barreira entre os agentes danosos presentes no lúmen e o organismo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; LINHARES, 2005).

FIGURA 05 - Representação esquemática da estrutura intestinal animal.



Reproduzido de MISODOR, 2013

Diante das importantes funções que o intestino exerce para a saúde do organismo, como: digestão e absorção de macro e micronutrientes, produção de importantes hormônios reguladores, pode funcionar como órgão imune e agir como barreira contra agentes nocivos é compreensível que doenças que acometam essa região possam trazer complicações para os esquemas terapêuticos (VLIET, 2010).

A avaliação da mucosite é um evento difícil, pois são poucos os instrumentos para avaliação da mucosite intestinal. As escalas utilizadas geralmente são baseadas em características indiretas da mucosite, como a diarreia, que pode ser causada por outras condições e intervenções, dificultando a interpretação. Segundo Keefe (2007) a escala National Cancer Institute (NCI) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)–NCI/CTCAE, utilizada na

avaliação da mucosite oral, provavelmente seja a mais adequada para avaliação da mucosite intestinal. A escala vai de assintomática (1) a morte (5), de acordo com a gravidade dos sinais e sintomas.

A diarreia, o sintoma mais marcante na mucosite intestinal, é observada em aproximadamente 80% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando se observa diarreia de grau 3-4 (>7 episódios de diarreia por dia havendo a necessidade de hidratação por um período superior às 24h) em até 25% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007).

Não existe um esquema padrão para a caracterização da mucosite intestinal. A fisiopatologia da mucosite intestinal, especialmente da diarreia de fase tardia não está completamente esclarecida. Muitos avanços têm sido feitos neste aspecto, em parte com a contribuição do laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer (LAFICA) e o Laboratório de estudos da Fisiofarmacologia Gastrointestinal (LEFFAG) que têm investigado os mecanismos fisiopatológicos associados à mucosite intestinal induzida pela quimioterapia (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2011; LEITÃO *et al.*, 2011; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015, FERNANDES *et al.*, 2018).

A utilização dos esquemas de escala como o proposto por Keefe *et al.* (2007) pode ser uma ferramenta importante, mas ainda existe uma enorme lacuna sobre os mecanismos que desencadeiam a mucosite intestinal. Muito do que conhecemos sobre a mucosite oral pode também ser aplicado a mucosite intestinal e alguns estudos se baseiam nas sequências de eventos descritas por Sonis (2004) (KEEFE *et al.* 2007; SONIS, 2004).

Sonis (2004) descreve a mucosite oral como resultado de uma complexa interação fisiopatológica em 5 fases: 1-iniciação; 2-*upregulation* e mensagem; 3-sinalização e amplificação; 4-ulceração e inflamação; 5-Cura. Brevemente, a fase 1 consiste na iniciação do dano gerado pela radio ou quimioterapia, com produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). As fases 2 e 3 consistem na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), levando à expressão de muitos genes, como de citocinas pró-inflamatórias, que ativam ainda mais NF-kB. A fase 4, ulcerativa, cursa com colonização bacteriana e produção de mais citocinas inflamatórias, o que amplifica a inflamação e o dano. Por fim, a fase de cura ocorre

como consequência da proliferação e diferenciação epitelial e restabelecimento da microbiota local. (SONIS 2004) (figura 06).

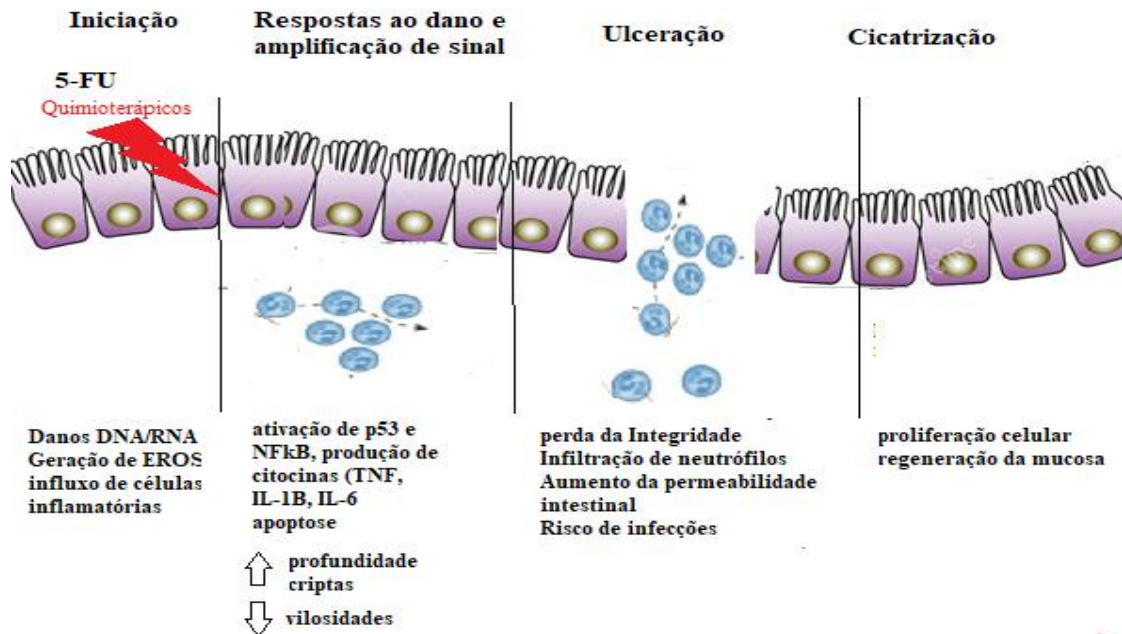


FIGURA 06 - Fases da mucosite intestinal. Fonte: Adaptado de Sonis, 2004 e Duncan e Grant, 2003

Apesar da origem embrionária semelhante entre a boca e intestino, o que permite a estrapolação do modelo da fisiopatologia da mucosite oral proposta por Sonis para mucosite intestinal, algumas ressalvas devem ser feitas com relação a isto. O modelo proposto por Sonis (2004) não considera o papel da microbiota na patogênese da mucosite. Sabe-se, entretanto, que a microbiota, abundante no intestino, pode influenciar as 5 fases do desenvolvimento da mucosite por meio da influência sobre o processo inflamatório, o estresse oxidativo, a permeabilidade intestinal, a composição da camada de muco, o reparo epitelial e sobre a resposta imune (VAN VLIET *et al.*, 2010).

Pelo que foi exposto é evidente que a etiologia da mucosite intestinal não pode ser explicada por um estímulo isolado, mas sim por uma cascata de eventos, onde o início pode ser atribuído ao efeito apoptótico do 5-FU direto sobre as células intestinais (WU *et al.*, 2011), somado a ação da microbiota na parede intestinal lesada, potencializando o efeito inflamatório pela presença de toxinas bacterianas e

consequentemente infiltrado de células de defesa (VON BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2003).

Ainda em relação a esses eventos, Duncan e Grant (2003) descrevem os mecanismos da mucosite intestinal em quatro fases: período inicial, restituição, inflamação, recuperação. A fase inicial caracteriza-se pela ação de fármacos antineoplásicos que bloqueiam a síntese do DNA por inibição da topoisomerase e síntese de timidilato. Podem também ocorrer alterações na molécula do ácido ribonucléico (RNA) e formação de radicais livres. Todas essas alterações inibem os processos mitóticos, que afetam a integridade celular e provocam o estímulo para o influxo de células inflamatórias e imunes da lâmina própria (DUNCAN e GRANT, 2003).

Durante a segunda fase, ocorre paralisação da divisão celular por algumas horas e apoptose. Há, portanto, uma indução da perda progressiva de células nas criptas e ativa os processos de restituição. Nesta etapa, há aumento da profundidade e diminuição do número de criptas, encurtamento dos vilos e depleção de células caliciformes (KEEFE *et al.*, 2007). Esta fase caracteriza-se por perdas de fluidos e colonização bacteriana (DUNCAN e GRANT, 2003). Por fim, no processo de recuperação ocorre uma significativa proliferação, que leva a restauração funcional das criptas. Consequentemente ocorre uma recuperação na estrutura e função dos vilos, com retorno da superfície absorptiva do intestino (DUNCAN e GRANT, 2003).

Cada fase é independente e consequência de uma série de ações mediadas por citocinas, fatores de crescimento, efeito direto do quimioterápico sobre o epitélio e da flora bacteriana sobre o epitélio lesado, além de depender do “*status*” da medula óssea do paciente (PICO *et al.*, 1998). Esses fatores são responsáveis pela destruição da mucosa do TGI, principalmente do intestino delgado, ocasionando o aparecimento de graves efeitos colaterais e contribuindo para a interrupção do tratamento, modificação no esquema de administração do fármaco, mudança na seleção do quimioterápico ou redução das doses, comprometendo a eficácia da terapia proposta e refletindo na saúde e qualidade de vida do paciente (SONIS, 2004; STRINGER *et al.*, 2009; VAN-VLIET *et al.*, 2010).

Um aspecto importante da mucosite intestinal induzida por antineoplásicos consiste no fenômeno da translocação bacteriana através de um epitélio danificado funcionalmente e estruturalmente, evento que parece desempenhar papel relevante

na toxicidade intestinal da quimioterapia e da radioterapia (FOX *et al.*, 1988; ALVERDY, 1990; SOUBA *et al.*, 1990). A destruição celular gastrointestinal observada na mucosite por uso de quimioterápicos, é resultado de hipoproliferação celular (ALTMAN *et al.*, 1974), com atrofia das vilosidades, aprofundamento das criptas que resulta de disfunção absorptiva, alteração na secreção de eletrólitos, principalmente Na^+ e K^+ , que pode resultar em diarreia (KEEFE; GIBSON e HAUER-JENSEN, 2004; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

Alterações da permeabilidade intestinal durante o curso da mucosite sugerem que os efeitos deletérios sistêmicos como desnutrição e desidratação advêm principalmente dos danos causados à capacidade absorptiva da mucosa intestinal (KEEFE, GIBSON e HAUER-JENSEN, 2004).

A inflamação intestinal pode desencadear consideráveis alterações na estrutura da mucosa, como infiltração de polimorfonucleares que atuam sobre as *tight junctions*, causando prejuízo na função de barreira, promovendo aumento da permeabilidade e dificultando a absorção (NUSRAT *et al.*, 1997; SEIDLER *et al.*, 2006). Foi também demonstrado por Madara *et al.* (1993), que os polimorfonucleares podem produzir adenosina monofosfato cíclico (cAMP) que se convertido em adenosina, ativa a secreção eletrogênica de cloreto e o transporte passivo de água para o lúmen intestinal. Com isso, é possível elucidar, parcialmente, a ocorrência da diarreia secretória em processos inflamatórios intestinais (SOARES *et al.*, 2013).

Estudos de Pritchard, Potten e Hickman (1998) mostram que p53 é responsável pela destruição de criptas decorrente do tratamento com 5-FU. Observou-se que camundongos deficientes para (p53^{-/-}) tratados com 5-FU tiveram menor resposta apoptótica comparado aos camundongos selvagens (p53^{+/+}). Nesta mesma linha, Gibson *et al.* (2005) observaram que o uso de MTX (5 mg/kg) induziu aumento da atividade pró-apoptótica, destruição grave das criptas e aumento da expressão de p53.

A citocina imunomoduladora IL-4 e pró-inflamatória IL-1 β também demonstraram importante função na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais nocautes para IL-4 tiveram aumento do comprimento das vilosidades intestinais, redução de mieloperoxidase e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-8), apresentando dessa forma importante papel no recrutamento de neutrófilos (SOARES *et al.*, 2013). A liberação de IL-4 promove migração de leucócitos,

incluindo neutrófilos, por aumentar a expressão de CCL2 ou por elevar a expressão do receptor de TNF do tipo 1 solúvel (sTNFR1) (RATTHE *et al.*, 2009).

As citocinas da família IL-1 e o seu receptor IL-1R são produzidos na mucosa intestinal (DAIG *et al.*, 2000). Após 24h de administração de 5-FU há elevada expressão gênica de IL-1 β na mucosa intestinal de ratos. Antagonista do receptor de IL-1 β reduziu a apoptose e transcrição gênica de fatores pró-apoptóticos como BAX e caspase-3 e, aumentar os fatores anti-apoptóticos como BCL-2, elevar a viabilidade de células epiteliais intestinais expostas ao 5-FU, bem como potencializar o efeito antitumoral do 5-FU (WU *et al.*, 2011a). Além disso, o uso desse antagonista também reduziu a perda de peso, aumentou a sobrevivência, diminuiu a severidade da diarreia e melhorou os parâmetros microscópicos, elevando o comprimento dos vilos (WU *et al.*, 2011b).

Na mucosite intestinal induzida por 5-FU também foi evidenciado o aumento de CXCL9, CXCR3 e TGF- β que foram implicados na redução da proliferação de células epiteliais ocorrente nesse processo. A quimiocina CXCL9 foi descrita como importante molécula sinalizadora desse processo via mTOR/p70S6K, estimulando a secreção de TGF- β que é um potente inibidor do crescimento da maioria das células epiteliais (LU *et al.*, 2015).

Soares *et al.* (2011) demonstraram por meio da utilização de animais nocautes para o receptor do fator ativador plaquetário (PAFR) e antagonista farmacológico desse receptor, que o fator ativador plaquetário (PAF) tem importante função nas alterações microscópicas e na suprarregulação de IL-8 induzida por 5-FU em modelo de mucosite intestinal. Em condições inflamatórias, PAF é sintetizado no intestino por células epiteliais e é um potente mediador de diversos processos inflamatórios, incluindo a síntese de eicosanoides, a indução de apoptose e a ativação de NF κ B (LU *et al.*, 2008; VENKATESHA *et al.*, 2004).

2.4.2. Possíveis alvos terapêuticos na mucosite intestinal

Evidencia-se na literatura a busca crescente de estratégias terapêuticas que vêm sendo utilizadas em modelos de mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU com a finalidade de desenvolver uma terapia capaz de reduzir eficazmente as alterações gastrintestinais tais como: a perda da integridade da barreira

morfofuncional, a diarreia, e a perda de peso que são advindas da mucosite induzida por este antineoplásico.

Podemos citar como exemplo o Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1), que foi implantado por via subcutânea na região supraescapular de ratos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU, melhorou apenas o comprimento das vilosidades e os parâmetros microscópicos (COOL *et al.*, 2005).

Ainda, foi observado que a minociclina, derivado semissintético da tetraciclina, reduziu a perda de peso e a severidade da diarreia induzidas por 5-FU em camundongos, bem como aumentou o comprimento das vilosidades do jejuno e do íleo, diminuiu a expressão gênica de IL-1 β e TNF- α , reduziu a apoptose e suprimiu a ativação de (ADP-ribose) polimerase 1 (PARP-1) (HUANG *et al.*, 2009).

Buscando utilizar estratégias de mecanismo de inibição enzimática Renck *et al.* (2014) também conseguiram reduzir a perda de peso e a severidade da diarreia através da administração do inibidor da uridina fosforilase-1 em ratos Wistar submetidos a mucosite intestinal por 5-FU (RENCK *et al.*, 2014)

Kawashima *et al.* (2015) demonstraram que o uso de dieta elementar pode ser eficaz na prevenção à mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos Wistar devido o aumento da produção de muco através da ativação de células produtoras de muco na mucosa intestinal (KAWASHIMA *et al.*, 2015).

Outra estratégia que tem sido utilizada nos últimos anos é o uso de probióticos para tentar evitar os danos causados pela utilização do 5-FU sobre o TGI. Nesse sentido Justino *et al.* (2014) demonstraram que *Saccharomyces boulardii*, conseguiu reduzir a inflamação e a dismotilidade gastrintestinal induzida por 5-FU, onde aumentou as vilosidades intestinais, reduziu o recrutamento de neutrófilos, aumentou os níveis de glutathiona reduzida (GSH), diminuiu os níveis de nitrito e nitrato e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), além de reduzir o esvaziamento gástrico e trânsito na porção proximal e distal do intestino delgado.

Foi demonstrado que fatores de sobrenadantes derivados de *Escherichia coli* Nissle 1917 reduzem a morte celular, retardando a apoptose e aumentando a resistência elétrica transepitelial em um modelo de lesão induzida por 5-FU em células epiteliais intestinais (WANG, 2014).

Justino *et al.* (2015) demonstraram que o probiótico *Lactobacillus acidophilus* apresenta papel regulatório sobre a mucosite intestinal induzida por 5-FU onde foi

capaz de reverter tanto o processo inflamatório quanto as alterações da motilidade gastrointestinal (JUSTINO *et al.*, 2015).

Mi *et al.* (2017) demonstraram que o probiótico *Bifidobacterium infantis* efetivamente atenua a mucosite intestinal induzida por quimioterapia, diminuindo a resposta Th1 e Th17 e aumentando a resposta de Tregs CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ (MI *et al.*, 2017).

Como exemplificamos acima existem evidências na literatura que mostram que o uso de probióticos é uma ferramenta que pode ser útil na terapêutica contra a mucosite intestinal induzida por 5-FU.

2.5. Microbiota intestinal, probióticos e *Bacillus clausii*

É sabido que o TGI é o sítio orgânico mais densamente povoado por microrganismos comensais e simbióticos, na maioria bactérias, mas também fungos, *Archaea* e vírus (ARUMUGAM *et al.*, 2011) abrigando dez vezes mais bactérias que o número de células que formam nosso organismo. Estudos de metagenômica indicam que, na microbiota humana, haja cerca de 3,3 milhões de diferentes genes, 150 vezes mais que o genoma humano (QIN *et al.*, 2010).

A figura 07 ilustra bem esses aspectos, mostrando a maior densidade bacteriana no íleo terminal e intestino grosso. Além de diferenças na microbiota, os intestinos delgado e grosso diferem com relação à camada de muco. No intestino delgado esta é descontínua e única, o que condiz com o requerimento da capacidade absorptiva dos enterócitos nesta região. Contrariamente, no intestino grosso, existe uma camada dupla e contínua de muco, vital para separar o epitélio da microbiota, rica neste local (OHANSSON *et al.*, 2008; WLODARSKA *et al.*, 2011). A camada mais interna é densa e livre de bactérias, enquanto que a camada mais externa é fina, onde residem as bactérias da microbiota (JOHANSSON *et al.*, 2011).

A microbiota intestinal pode perder sua homeostase por diversos fatores endógenos e exógenos, tais como composição da dieta, estilo de vida, envelhecimento, desordens peristálticas, câncer, cirurgias, doenças hepáticas ou renais, anemia perniciosa, síndrome da alça cega, radioterapia, estresse emocional, desordens do sistema imunológico, antibioticoterapia, entre outros (ARUMUGAM *et al.*, 2011). Muitos desses microrganismos podem exercer efeitos

benéficos tendo ações importantes sobre a homeostasia caracterizando-se como probióticos.

Van-Vliet *et al.* (2010) propuseram a participação efetiva da microbiota intestinal comensal no desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias intestinais, tais como Doença de Crohn, estomatite (mucosite oral) e mucosite intestinal induzida pela radioterapia e quimioterapia. Os autores sugeriram cinco pontos importantes no desenvolvimento da mucosite potencialmente influenciados pela microbiota intestinal comensal: 1) processo inflamatório e estresse oxidativo; 2) permeabilidade intestinal; 3) composição da camada mucosa; 4) resistência à estímulos nocivos e mecanismos de reparo epitelial e 5) ativação e liberação de moléculas efetoras imunes (VAN VLIET *et al.*, 2010).

Alguns estudos adicionalmente tem mostrado a participação da microbiota na mucosite intestinal como foi evidenciado por Wong *et al.* (2015) onde esses autores indicaram bacteremia e aumento da translocação bacteriana para órgãos secundários, tais como fígado e linfonodos mesentéricos nos camundongos tratados com irinotecano (WONG *et al.*, 2015). No que se refere à disbiose intestinal induzida pelo irinotecano, Stringer *et al.* (2007) evidenciaram um aumento de enterobactérias patogênicas, dentre elas a *Escherichia coli*, produtora de β -glicuronidase no intestino delgado exacerbando a lesão intestinal (STRINGER *et al.*, 2009).

Dessa forma, vale ressaltar o papel relevante da microbiota intestinal comensal na patogênese da mucosite e que a sua modulação com probióticos é fundamental para o tratamento dessa doença.

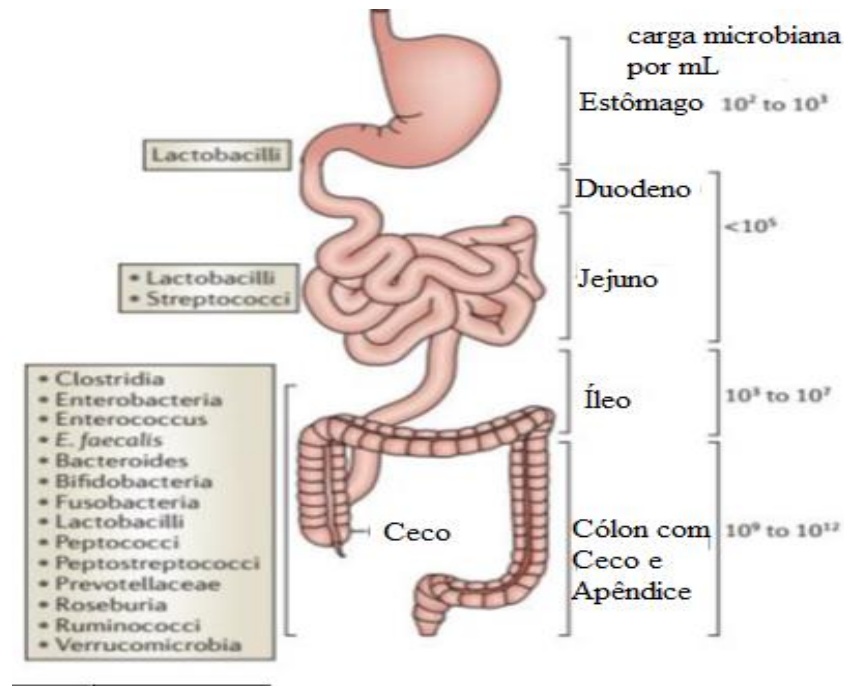


FIGURA 07 - Distribuição espacial e composição da microbiota ao longo do trato gastrointestinal. O intestino é a maior fonte de microrganismos comensais, com mais de 500 espécies diferentes e o número de bactérias geralmente aumenta ao longo do trato gastrointestinal na direção do cécum sendo que no íleo terminal chega a conter uma quantidade grande de bactérias, assim como o cólon. (MOWAT e AGACE , 2014)

Li *et al.* demonstraram em camundongos Balb/c que, além da mucosite do intestino delgado, 5-FU também induz mucosite cólica. Tanto a microbiota intestinal quanto os perfis inflamatórios de citocinas/quimiocinas foram alterados significativamente, o que foi acompanhado de danos à barreira mucosa e ativação da via de sinalização inflamatória (LI *et al.*, 2017)

Nessa perspectiva é evidente que a manipulação da microbiota pode constituir-se como uma alternativa terapêutica eficaz através do uso de probioticoterapia.

O termo probiótico possui deriva do grego *pro* (a favor) e *bio* (vida), e foi proposto inicialmente para descrever compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano. Os probióticos eram definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o seu balanço microbiano (FULLER, 1989). Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que eles são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WHO, 2002; SANDERS, 2003).

Vários microrganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido-láticas e leveduras. Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que têm sido isoladas de todas as porções do TGI humano saudável. O íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias. Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se a *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei-subsp.paracasei* e *subsp.tolerans*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. Salivarius* (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

Para que os probióticos possam atuar satisfatoriamente no organismo, eles devem apresentar algumas características específicas: serem habitantes normais do intestino; reproduzirem-se rapidamente; produzirem substâncias antimicrobianas; resistirem ao tempo entre a fabricação, comercialização e ingestão do produto devendo atingir o intestino ainda vivos na concentração mínima de 10^6 UFC/mL ou g. Assim, o mecanismo de atuação dos probióticos no organismo se refere principalmente à inibição que estes exercem na colonização do intestino por bactérias patogênicas. Os mecanismos através dos quais os probióticos reduzem as bactérias patogênicas seriam: produção de substâncias bactericidas; disputa por nutrientes; alteração do metabolismo microbiano; estimulação do sistema imunológico a partir da capacidade de adesão à mucosa intestinal (ALVARENGA *et al.*, 2001).

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 consciência de 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 de fungos: *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*, e *Monascus purpureus* (MCFARLAND, 2009; CZERUCKA *et al.*, 2007; JUSTINO *et al.*, 2014, 2015).

Nesse sentido, Justino *et al.* (2014) demonstraram que o tratamento com o probiótico *Saccharomyces boulardii* reverteu de forma significativa às alterações inflamatórias e da disfunção da motilidade gastrointestinal causadas pelo 5-FU. (JUSTINO *et al.*, 2014). Demonstraram ainda que o probiótico *Lactobacillus acidophilus* apresenta papel regulatório sobre a mucosite intestinal induzida por 5-FU onde foi capaz de combater tanto o processo inflamatório quanto as alterações da motilidade gastrointestinal (JUSTINO *et al.*, 2015).

Dando continuidade a esses estudos sobre o uso de probióticos durante as alterações intestinais advindas da mucosite intestinal induzida por 5-FU resolvemos investigar o probiótico Enterogermina (Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda) cujas cepas estão agrupadas sobre o nome *Bacillus clausii* (*B. clausii*) e avaliar sua ação sobre os eventos inflamatórios e a disfunção intestinal induzida pelo tratamento com 5-FU.

B. clausii é uma bactéria gram-positiva, aeróbia, formadora de endosporos. Suas características relevantes são a produção de catalase e oxidase, hidrólise de amido, redução de nitrato, o crescimento em temperaturas de 30° a 50° C em ambientes de salinidade de até 10% de NaCl. O teor de guanina e citosina do seu DNA é de cerca de 43% (NIELSEN *et al.*, 1995).

Estirpes de *B. clausii* são frequentemente encontradas como componentes de microflora do solo e algumas propriedades podem ser utilizadas para aplicações importantes em campos industriais notadamente alcalinos e em Biotecnologia na produção de protease e de xilanase (NIELSEN *et al.*, 1995;. KUMAR *et al.*, 2004).

A atividade probiótica de *B. clausii* lida com a prevenção e tratamento da diarreia aguda e infecções intestinais (MAZZA, 1994), aos efeitos gastrointestinais secundários devido à antibioticoterapia (MAZZA *et al.*, 1992; NISTA *et al.*, 2004), atividade imunomoduladora, estimulando a regulação de imunoglobulinas sistêmicas (IgA, IgG), e afetando o padrão de citocinas em humanos (CIPRANDI *et al.*, 2004).

Os esporos de *B. clausii* sobrevivem ao trânsito gastrointestinal humano. Eles podem sofrer germinação, crescimento e multiplicação como formas vegetativas. As estirpes de *B. clausii* podem ter diferentes capacidades para sobreviver no ambiente

intestinal e podem ser administrados como suspensão líquida ou forma liofilizada comportando-se de forma semelhante *in vivo* sendo capaz de sobreviver durante o seu trânsito GI e manter quantidade considerável no intestino por até 12 dias após uma única administração oral tendo capacidade de germinar 6 horas após a administração (GHELARDI *et al.*, 2015).

Estudos experimentais mostram que essa espécie de bacilo apresenta atividade antimicrobiana contra espécies gram-positivas (por exemplo, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium difficile*) e é capaz de induzir tanto a proliferação de células T CD4⁺ de murino e a ativação de populações de leucócitos peritoneais e do baço (URDACI *et al.*, 2004).

Diante dos efeitos da utilização de *B. clausii* na prevenção e tratamento da diarreia aguda e infecções intestinais, aos efeitos gastrintestinais secundários devido à antibioticoterapia, atividade imunomoduladora, estimulando a regulação de imunoglobulinas sistêmicas e afetando o padrão de citocinas em humanos em outras regiões do organismo, resolvemos investigar se o tratamento com *B. clausii* pode atenuar a inflamação e a disfunção gastrintestinal induzida por 5-FU em camundongos.

2.6. Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer–LAFICA e Laboratório de Estudos da Fisiofarmacologia Gastrintestinal-LEFFAG e sua contribuição para a compreensão da Mucosite Intestinal

Muitos dos conhecimentos atuais sobre a patogênese da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos se deve a importante contribuição desses dois grupos de pesquisa na elucidação dos mecanismos relacionados a essa enfermidade.

Há mais de uma década esses dois grupos tem acumulado expertise e vem desenvolvendo ou aprimorando modelos experimentais de mucosite intestinal com antineoplásicos dedicando-se ao estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos nos efeitos colaterais da quimioterapia do câncer, como a mucosite intestinal. Mais recentemente foram incorporadas aos estudos sobre a mucosite intestinal estratégias terapêuticas que visam atenuar ou fazer cessar os efeitos colaterais advindos do uso de antineoplásicos, dentre eles os possíveis alvos terapêuticos como o uso de probióticos e mais recentemente a ativação de Linfócitos T reguladores (Treg).

Sendo assim, desde 2004 foi sugerido que o TNF- α teria um importante papel na fisiopatologia da mucosite oral por 5-FU. Em modelos de mucosite induzida por 5-FU em hamsters foi demonstrado que a pentoxifilina (PTX) e a talidomida (TLD) foram capazes de inibir a lesão macroscópica e microscópica, bem como o aumento da atividade de mieloperoxidase (MPO), observada nos animais tratados com 5-FU (LIMA *et al.*, 2005).

Leitão *et al.* (2007) também demonstraram o papel relevante do óxido nítrico na gênese da mucosite oral por 5-FU através da observação de que inibidores seletivos da óxido nítrico sintase induzível (iNOS/1400W e aminoguanidina) reduziram a lesão macroscópica e microscópica, bem como a infiltração de neutrófilos medida pela atividade de MPO na bochecha de hamsters com mucosite oral por 5-FU, além de se demonstrar a expressão da iNOS por imunohistoquímica e western blot (LEITÃO *et al.*, 2007).

Medeiros *et al.* (2010) demonstraram também que a atorvastatina (ATV) reduziu, significativamente, as lesões macroscópicas e microscópicas induzidas pelo 5-FU na mucosa oral de hamsters. Os efeitos macroscópicos de proteção foram associados com a redução da produção de TNF- α e IL-1 β , diminuição da infiltração de neutrófilos, demonstrados pela análise histopatológica e da atividade da MPO. Além disso, a ATV reduziu o estresse oxidativo induzido (MEDEIROS *et al.*, 2010).

Estudando os mecanismos envolvidos na mucosite intestinal por antineoplásicos, pesquisadores desse grupo também foram responsáveis por demonstrar que o tratamento com metotrexato em ratos induz uma acentuada atrofia de vilos com aumento das criptas, no duodeno, jejuno e íleo. Observaram ainda, que o metotrexato foi capaz de aumentar a secreção de sódio e potássio medido pelo modelo de perfusão intestinal, bem como reduziu a área absorptiva medida pela razão de excreção do manitol (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

Em estudos envolvendo o tratamento com irinotecano (CPT-11) em camundongos foi observado que esse antineoplásico causou uma significativa diarreia nos animais, com diminuição dos vilos intestinais e perda da arquitetura das criptas. Observaram ainda, um aumento na concentração intestinal de TNF- α , IL-1 β e CXCL1. Demonstraram também que o TNF- α , IL-1 β e CXCL1 são importantes mediadores na patogênese da mucosite intestinal e que a pentoxifilina (PTX) e a talidomida (TLD) tiveram um efeito protetor nas estruturas intestinais. No entanto, apenas a PTX reduziu a severidade da diarreia induzida por CPT-11. Este resultado

pode ser explicado pelo fato da TLD ser mais seletiva na inibição do TNF- α (MELO *et al.*; 2007).

Foi demonstrado também que a mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos está associada a alterações na motilidade digestiva que persistem mesmo com a resolução do processo inflamatório após 15 dias (SOARES *et al.*, 2008).

Ainda contribuindo com o entendimento da mucosite intestinal Soares *et al.* (2010) demonstraram pela primeira vez o papel do fator de ativação plaquetária (PAF) na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU usando ratos PAFR⁻ e com a inibição farmacológica do receptor de PAF, com BN52021. Demonstraram que os ratos PAFR⁻ foram protegidos contra os danos causados pelo tratamento com 5-FU na microscopia intestinal.

Foi demonstrado ainda por Soares *et al.* (2011) que a mucosite intestinal induzida por MTX está associada a um atraso no esvaziamento gástrico e no trânsito gastrintestinal de líquidos em ratos acordados e eles sugerem que poderia haver uma via fisiopatológica entre a mucosite intestinal e a síndrome da dispepsia associada ao tratamento com MTX (SOARES *et al.*, 2011).

Soares *et al.* (2013) foram importantes em revelar o papel da IL-4 na indução da mucosite intestinal com um aumento concomitante da concentração de IL-4 em camundongos de tipo selvagem em comparação com os de tipo selvagem não tratados. Além disso, o nocaute da IL-4 impediu as alterações patológicas da mucosite induzida por 5-FU (diminuição da relação viloso/cripta, infiltração de neutrófilos e aumento do nível das citocinas TNF- α , IL- β e CXCL-8) no duodeno dos ratos. Desta forma, este autor demonstrou o papel pró-inflamatório para essa interleucina na mucosite intestinal induzida por 5-FU sugerindo que o tratamento com antagonistas de IL-4 pode ser uma estratégia terapêutica lógica e inovadora para esta condição (Soares, *et al.*; 2013).

Como contribuição a possíveis alvos terapêuticos contra a mucosite intestinal importante contribuição foi dada por Justino *et al.* (2014) demonstrando que *Saccharomyces boulardii*, conseguiu reduzir a inflamação e a dismotilidade gastrintestinal induzida por 5-FU, onde aumentou as vilosidades intestinais, reduziu o recrutamento de neutrófilos, aumentou os níveis de glutatona reduzida (GSH), diminuiu os níveis de nitrito e nitrato e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), além de reduzir o tempo de esvaziamento gástrico e trânsito na porção proximal e distal do intestino delgado.

De maneira semelhante Justino *et al.* (2015) demonstraram que o probiótico *Lactobacillus acidophilus* apresenta papel regulatório sobre a mucosite intestinal induzida por 5-FU onde foi capaz de combater tanto o processo inflamatório quanto as alterações da motilidade gastrointestinal (JUSTINO *et al.*, 2015).

Lima-Júnior *et al.* (2015) demonstraram que a inibição de IL-18 atenuou a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos. À medida que a atividade de IL-18 é equilibrada pela presença de uma elevada afinidade, IL-18bp de ocorrência natural, a suplementação de IL-18bp endógena, com IL-18bp exógena, para inibir seletivamente a função de IL-18 pode ser uma abordagem terapêutica promissora para mucosite intestinal (LIMA-JÚNIOR, *et al* 2015).

Pereira *et al.* (2016) contribuíram com a elaboração de um modelo animal que combina dois medicamentos que são comumente usados nos mesmos regimes anticancerígenos na prática clínica. Nesse estudo, elaboraram o modelo experimental de mucosite intestinal combinando irinotecano e 5-FU, caracterizado por pronunciado dano intestinal acompanhado de uma reação inflamatória e diarreia. Utilizaram doses muito mais baixas (doses subclínicas) do que as utilizadas em estudos anteriores em que os mesmos agentes quimioterapêuticos foram administrados sozinhos (PEREIRA, *et al.*; 2016).

Ribeiro *et al.* (2016) sugeriram que o bloqueio farmacológico do TLR-2 mostra-se potencial alvo terapêutico para atenuar a toxicidade da quimioterapia (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Mais recentemente Fernandes *et al.* (2018) demonstraram pela primeira vez o papel de células T reguladoras (Tregs) no controle da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, uma vez que o esgotamento dessas células exacerbou o dano tecidual e aumentou a mortalidade animal. Para esses autores, a modulação do sistema imunológico em sinergia com a quimioterapia antitumoral é atualmente um marco na oncologia, mas os esforços para o manejo adequado de efeitos colaterais, como a mucosite, devem ser especialmente considerados para melhorar a qualidade de vida dos pacientes (FERNANDES *et al*, 2018).

3. JUSTIFICATIVA

O câncer é responsável por 15% de todas as causas de óbito no mundo, mais de 8,8 milhões de pessoas morrem anualmente (IARC-OMS, 2017). Estima-se que em 2030, o ônus global do câncer será de 21,4 milhões de casos novos e 13,2 milhões de mortes. Dentre as neoplasias, podemos destacar as de mama e de cólon e reto. O câncer de mama, no panorama mundial, corresponde ao segundo tipo de neoplasia mais frequente, 25% de casos novos anualmente (GLOBOCAN, 2012) sendo o primeiro e mais letal na população feminina. Para o Brasil, biênio 2018-2019, estima-se a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer. A estimativa prevê 17.380 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 18.980 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. É o terceiro mais frequente em homens e o segundo entre as mulheres (INCA-MS 2018).

Se por um lado o uso de antineoplásicos é uma estratégia para aumentar a sobrevida dos portadores de câncer, por outro lado, a ocorrência da mucosite intestinal com eventos inflamatórios importantes e dismotilidade traz como consequência uma perda da qualidade de vida dos pacientes, infringindo aos mesmos, diversos sintomas adversos tais como: saciedade precoce, náusea, vômitos, diarreia, anorexia, dor abdominal, além de perda de peso e consequentemente baixa da imunidade com risco de infecções sistêmicas reduzindo as chances de sobrevida ao câncer.

Sabendo que a mucosite intestinal é um grave efeito colateral do tratamento quimioterápico com 5-FU e que a ocorrência desta culmina na redução dos ciclos e/ou doses da quimioterapia, prejudicando a eficácia terapêutica dos antineoplásicos, além de aumentar os dias de hospitalização e os custos com a saúde como um todo, o que leva em muitas vezes, ao abandono do tratamento anticâncer bem como consequências mais sérias que resultam na morte do paciente é de suma importância o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que possam ser coadjuvantes ao tratamento.

Em virtude de apresentar efeito já estabelecido sobre patologias do trato gastrointestinal, mas ainda não comprovados sobre a mucosite intestinal e, por existirem indícios de sua participação em eventos inflamatórios e fisiológicos do TGI

tais como o controle de quadros de diarreia e no combate a microrganismos patogênicos acredita-se que *B. clausii*, pode exercer seus efeitos probióticos em doenças que acometem o TGI tais como a mucosite causada por 5-FU cuja participação desse microrganismo probiótico ainda não foi investigada.

Acreditamos que a pesquisa com *B. clausii* pode comprovar seu papel probiótico além do que já está estabelecido na literatura e mostrar sua importante participação como protetor durante a mucosite intestinal e ampliar o leque de indicações desse composto. Fatos que nos fazem sugerir tal efeito protetor desse probiótico são evidenciados em casos fora do TGI, mas acreditamos que sua capacidade de induzir vias anti-inflamatórias podem também ser reproduzidos nessa região do corpo. Hipotetizamos que as alterações gastrintestinais (tanto a inflamação quanto a perda da função) advindas da mucosite intestinal induzidas por 5-FU podem ser revertidas pelo tratamento com o probiótico *Bacillus clausii*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *B. clausii* na resposta inflamatória e nas alterações funcionais no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.

4.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *B. clausii* sobre alterações histopatológicas, morfométricas, condições inflamatórias (atividade de MPO) e oxidantes (GSH e MDA) no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *B. clausii* sobre as alterações de esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal presentes no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *B. clausii* sobre as alterações do transporte intestinal de água e eletrólitos presentes no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *B. clausii* sobre as alterações de permeabilidade intestinal presentes no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *B. clausii* sobre as alterações de contratilidade da musculatura lisa intestinal presentes no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU.
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com *B. clausii* sobre as alterações de resistência elétrica transepitelial (TEER) presentes no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso variando entre 25 a 30 g, procedentes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com água e comida à vontade e com ciclo de luz e escuro. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e esse projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa com Animais-UFC sob o número 141/2014.

5.2. Indução da mucosite e tratamento com *B. clausii*

Os animais foram separados em 04 grupos experimentais, conforme o esquema de administração (salina, salina + *B. clausii*, 5-FU e *B. clausii* + 5-FU). Os animais dos animais tratados com 5-FU e *B. clausii* + 5-FU receberam injeção única, por via intraperitoneal (i.p.), de 5-Fluorouracil (5-FU, adquiridos da empresa EUROFARMA), volume corresponde a dose de 450 mg/kg, marcando o dia 0 da indução. Os grupos salina e salina + *Bacillus* receberam (i.p), volume correspondente a 450 mg/kg de solução salina. Após 30 minutos os animais foram divididos em 2 grupos: um que recebeu apenas salina por gavagem (5 administrações de 0,5 mL, no intervalo de 30 minutos a cada administração, 2,5 mL/animal). Da mesma forma o outro grupo recebeu solução de esporos de

B. clausii (5 administrações de 0,5 mL, no intervalo de 30 minutos a cada administração). Essa administração de 2,5 mL corresponde, segundo o fabricante, a 10^9 esporos de *B. clausii*.

Durante os 03 dias que correspondem ao pico inflamatório induzido por 5-FU foram repetidas as administrações de salina e *B. clausii*. Ao final do 3º dia de administração do 5-FU os animais foram sacrificados e posteriormente, foi realizada uma laparotomia e exérese do intestino delgado. Então amostras do duodeno, jejuno e íleo foram obtidas obedecendo a sua divisão anatômica, da seguinte forma percentual: 20% de duodeno; 60% de jejuno e 20% de íleo (FERRARIS; VINNAKOTA, 1995). No estudo da contratilidade foi utilizado amostras no comprimento de 1 cm, sempre utilizando o primeiro segmento proximal, do duodeno, do jejuno e do íleo, enquanto que as demais amostras de cada segmento foram acondicionadas em freezer a -80°C para posteriormente serem submetidos aos protocolos de avaliação para cada estudo desenvolvido como exemplificado na figura 08

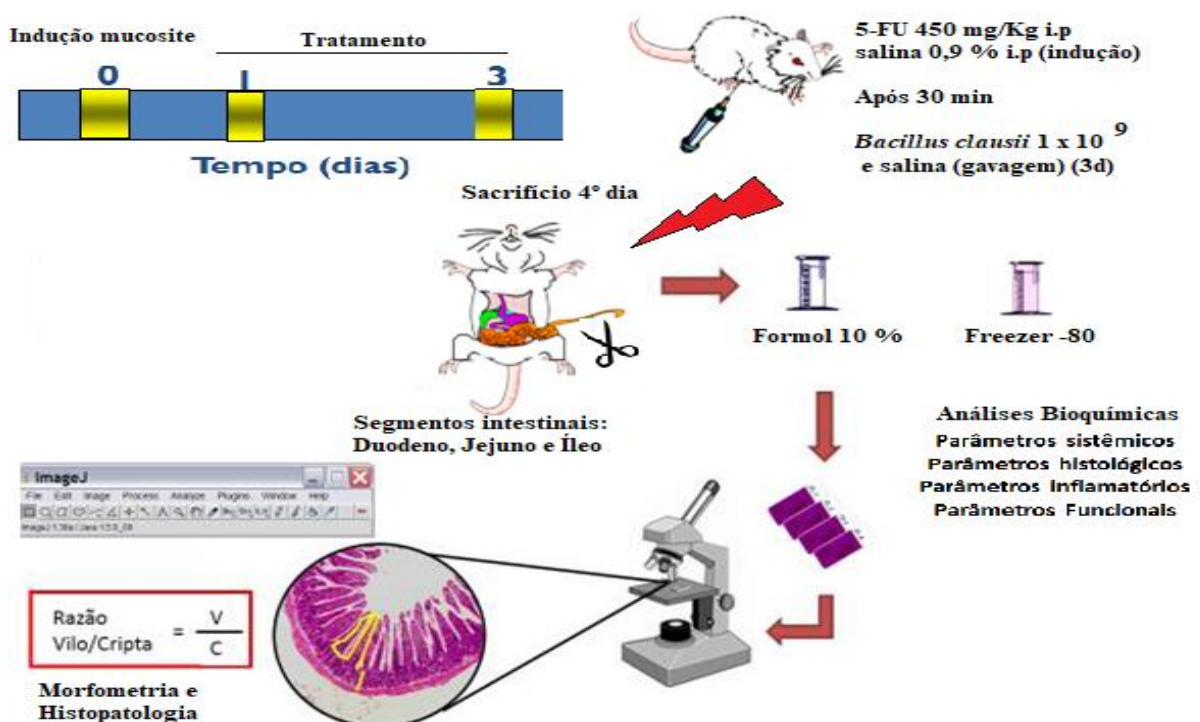


FIGURA 08 - Representação esquemática da indução da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos e retirada de materiais biológicos com exemplificação das análises realizadas

5.3. Parâmetros avaliados na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos

5.3.1. Curva Ponderal

Um importante fenômeno no curso da mucosite é a perda de peso que pode ser decorrente de diarreia, caracterizada pelo desequilíbrio entre absorção e secreção no intestino. No intuito de avaliar a perda ou o ganho de peso dos animais dos 04 grupos experimentais durante os 03 dias que correspondem ao curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU, os animais foram pesados e ao final foi montada uma curva ponderal em porcentagem, considerando o peso inicial como 100% (JUSTINO *et al.*, 2015).

5.3.2. Contagem de leucócitos no sangue

As amostras de sangue obtidas por punção cardíaca dos trinta e dois camundongos Swiss masculinos dos 4 grupos experimentais acima descritos foram transferidas para tubos de ensaio, heparinizadas e diluídas em solução de Turk (380 mL de sangue e 20 mL de solução diluente). Então, as células foram contadas em uma Câmara Neubauer sob um microscópio de luz (SOARES *et al.*, 2008).

5.3.3. Análise morfométrica e histopatológica

As amostras do duodeno, jejuno e íleo obtidas após o sacrifício dos animais foram fixadas numa solução de formol 10% por 24 h. Em seguida foram transferidas para uma solução de álcool 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Posteriormente, o material biológico foi seccionado e embebido em parafina. Logo depois, foram feitos cortes (5 µm), colocados numa lâmina e corados com hematoxilina/eosina (H/E) para análise ao microscópio óptico.

A avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo duplo-cego. O grau e a severidade da mucosite foram determinados de acordo com o sistema de escores como indicado na tabela 03.

A análise morfométrica dos segmentos intestinais foi obtida pela avaliação da altura dos vilos e da profundidade das criptas, utilizando-se microscópio óptico com ocular milimetrada ou sistema de aquisição de imagens e posteriormente utilizado o software de medida (LEICA). A análise foi obtida a partir da medida de 10 vilos e criptas para obtenção da medida estimada da altura dos vilos e da profundidade das criptas, bem como da relação vilo/cripta dos animais avaliados.

TABELA 03 - Sistema de escores de acordo com Macpherson e Pfeiffer (1978)

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

5.3.4. Ensaio para mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos (KLEBANOFF, 2005), o que permite estimar a sua infiltração no foco inflamatório por dosagem da sua atividade (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010), pois as concentrações teciduais da MPO estão relacionadas com o número de neutrófilos em um dado tecido (GENOVESE, 2006). Portanto, tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrintestinal. A medida de atividade de MPO baseia-se na velocidade de oxidação do substrato H_2O_2 na presença de α -dianisidina, evidenciada pela mudança de absorvância medida a 450nm.

Resumidamente, 50 a 100 mg do tecido gastrointestinal dos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU, foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados num Politron. e homogeneizadas num Politron. Em seguida, centrifugadas (4500 rpm, 20 min, 4°C) e colhido o sobrenadante. A atividade da MPO foi quantificada através da técnica descrita por Bradley e colaboradores (1982), utilizando 0,0005% de peróxido de hidrogênio e o-dianosidine como substrato para a MPO. A unidade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 mmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 minuto a 22°C. À medida que ocorre degradação do peróxido de hidrogênio o ânio superóxido é produzido. Este é responsável por converter o-dianisidina em composto de cor marrom. As leituras foram realizadas a 450nm em espectrofotômetro UV/visível (Thermo Scientific, modelo BioMate 3S) e os resultados expressos como unidade de MPO/mg de tecido (BRADLEY *et al*, 1982).

5.3.5. Análise do Malonaldeído

A presença de estresse oxidativo tem como alvo o ataque aos ácidos graxos dos lipídios da membrana, terminando com a quebra de lipídeo peroxidado, aparecimento de malondialdeído (MDA) e outros produtos. Amostras de jejuno e íleo foram retiradas de 06 animais por grupo experimental citado anteriormente. Após a retirada os materiais foram congelados no freezer -80 e posteriormente foram avaliados usando o método do Tbars adaptado, como o descrito por Lee *et al.* (2012). A mistura de 50µL de soro com 100µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) ficou em banho-maria por 30 min a 37°C. Em seguida foi adicionado 200µL do ácido tiobarbitúrico (0,6%) nos tubos e esta solução permaneceu em banho-maria por mais 50min a 100°C. Como padrão foi utilizado o 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TMP). O sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro e o resultado expressa a diferença de absorbâncias entre as faixas 535 nm e 525 nm, tendo como unidade nmols de MDA/g de tecido. O sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro na faixa de 535nm (DANTAS, 2006).

5.3.6. Ensaio para Glutathiona

A glutathiona reduzida (GSH) é um grupo sulfidrílico não proteico que tem ação primordial como antioxidante, sendo essencial na proteção das células contra o estresse oxidativo e na multiplicação dos linfócitos. A dosagem da GSH foi realizada segundo o método de Sedlak & Lindsay (1968) para analisar o consumo de GSH nas amostras de duodeno, jejuno e íleo dos grupos da pesquisa. Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não protéicos, uma amostra de 50 a 100 mg de duodeno, jejuno e íleo dos animais induzidos com 5-FU e controle foi homogeneizada em 1 ml de Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,02 M para cada 100 mg de tecido. Alíquotas de 400 µL do homogeneizado foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de Ácido Tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas os tubos foram centrifugados (3.000 rpm, 20 min, 4 °C). Para 400 µL do sobrenadante foi adicionado 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8,9) e 20 µL de DTNB 0,01 M (reagente de Ellman). A mistura foi agitada por 3 minutos e a absorbância lida a 412nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-proteicos foram expressas em µg de NP-SH/g de tecido (SEDLAK e LINDSAY, 1968)

5.3.7. Medidas de contratilidade com fármacos

Foram utilizados tiras longitudinais de íleo e jejuno (1,5-2cm), sendo essas tiras lavadas para retirada de resíduos com solução nutritora de Krebs (pH= 7.4), composição (mmol/l): 128 NaCl, 4,5 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,18 MgSO₄, 1,18 KH₂PO₄, 125 NaHCO₃ e 5,55 glicose. As tiras foram montadas em câmaras orgânicas com volume de 5ml, contendo solução de Krebs, a temperatura de 37°C, pH=7.4, oxigenadas com mistura de 5% de CO₂ e 95% de O₂, uma das extremidades da tira ficava presa à base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico (modelo Panlab S.L, Barcelona, Espanha). Tensão de 1g foi aplicada por um período de equilíbrio de 60 minutos. Para avaliar a responsividade do tecido utilizou-se Carbacol (10⁻¹⁰ a 10⁻⁴M) além de KCl na concentração de 60 mM.

Os valores de contração ou relaxamentos obtidos nos segmentos intestinais pelo KCl foram expressos em gráficos de coluna como resultado do Δg (em gramas) de contração fornecendo informações sobre a contratilidade muscular,

mas sem discriminar entre alterações tróficas e funcionais (FARMER e LANIYONU 1984). Por isso, para normalização da resposta contrátil faz-se necessário expressar contrações como a percentagem de uma contração de referência (GOLDHILL *et al.*, 1999). Assim, foi utilizado a relação percentual da contração em KCl 60mM. Para cálculo do Δg de contração, foi estabelecido como valor inicial o vale mais estável antes do estímulo (KCl) e como valor final o pico maior e mais estável depois do estímulo que representa o valor da contração máxima (MOREELS *et al.*, 2001).

5.3.8. Modelo de estimulação elétrica

Tiras de intestino (jejuno e íleo) foram obtidos de animais controle, *B. clausii*, 5-FU e *B. clausii* + 5-FU no 3º dia experimental. Posteriormente esses tecidos foram montados em câmaras de banho de órgãos contendo solução nutritiva de Krebs e sob condições ideais de temperatura, aeração e pH (37°C, 95% O₂/5% CO₂, 7,4, respectivamente). Antes do início dos protocolos experimentais esses tecidos permaneceram por 1h na condição de equilíbrio.

Para esses experimentos foram utilizados os seguintes parâmetros elétricos: voltagens variando de 20 e 40 V, 1ms, e a duração do estímulo foi de 10 s. Foi obtida então uma curva de frequência variando de 4, a 8 Hz, os valores obtidos pelos tecidos estimulados foram comparados com dados obtidos das contrações desses tecidos induzidos por KCl 60mM. Para a avaliação do Δg elétrico, o vale mais estável que antecede o estímulo de 10 V foi estabelecido como valor inicial para todas as respostas elétricas, ou seja, antes do primeiro estímulo elétrico, essa escolha padronizou um valor basal universal antes de qualquer atividade elétrica para todos os estímulos elétricos, já o valor final foi escolhido pelo maior pico depois de cada estímulo (LIMA *et al.*, 2016)

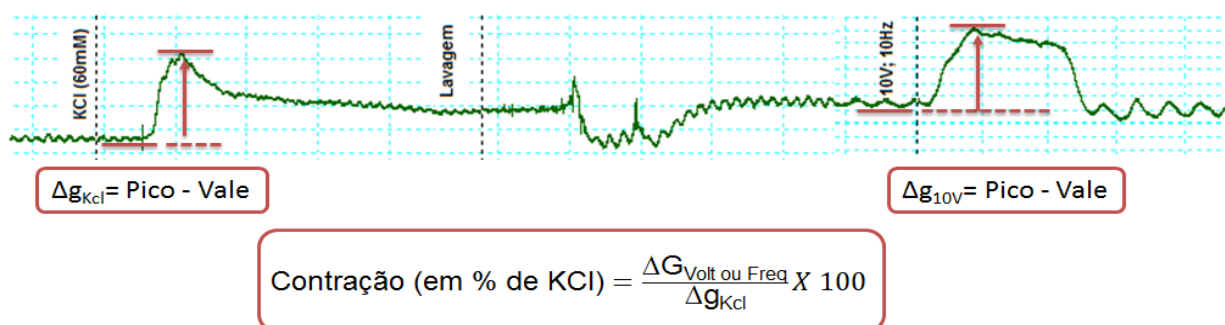


FIGURA 09 - Modelo de avaliação da resposta contrátil. Reproduzido com autorização de Lima, 2016.

5.3.9. Avaliação do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal

O esvaziamento gástrico e trânsito intestinal foram avaliados através da técnica de Reynell & Spray (1978) modificada. Os animais foram divididos em grupos como especificado no item 5.2. Inicialmente, os animais receberam, por gavagem, 300 µL da refeição teste que consiste de um marcador não absorvível (0,75 mg/mL de solução de fenol vermelho em 5% de glicose). Decorridos 20 minutos, os animais foram sacrificados por uma overdose de tribromoetanol. Após a laparotomia, o estômago e o intestino delgado foram expostos, rapidamente isolados, por ligaduras nas junções esôfago-gástricas, gastro-duodenal e ileo-cecal, e finalmente removidos. Após as duas primeiras ligaduras, o estômago e o intestino delgado foram, então, cuidadosamente removidos (exérese) e posteriormente estendidos sobre uma prancha, com intuito de se determinar sua extensão, mensurado em cm. Finalmente, uma terceira ligadura foi colocada no íleo terminal, ao nível da junção íleocecal. As vísceras expostas foram divididas em quatro segmentos consecutivos: Estômago (Et), Intestino proximal (P – inicial), Intestino medial (M – intermediário) e Intestino distal (Dt – final). O intestino foi dividido nas seguintes proporções: P (40%), M (30%) e Dt (30%).

Cada um destes segmentos foi introduzido num cilindro graduado e o volume total foi aferido através da adição de 10 ml de 0,1 N NaOH. Para determinação dos volumes das vísceras, foi utilizada uma simples diferença volumétrica, como mostra a fórmula abaixo:

$$\text{VOL.}(v) = \text{VOL.}(t) - \text{VOL.}(p).$$

Onde: Vol. (v) = Volume visceral.

Vol. (p) = Volume da proveta contendo 100ml.

Vol. (t) = Volume total [Vol. (p) + víscera].

A seguir, os segmentos foram cortados em pequenos fragmentos e homogeneizados por 30 s. Após 30 minutos da homogeneização, 1 mL do sobrenadante foi centrifugado por 10 min à 2800 rpm. As proteínas no homogeneizado foram precipitadas através da adição de ácido tricloroacético (20%), e novamente centrifugadas por 20 min à 2800 rpm. A seguir, 150 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 mL de 0,5 N de NaOH. A absorbância das amostras foi estabelecida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540nm e expresso em densidade óptica (D.O.). A curva padrão foi obtida da medida

por espectrofotômetro à 540 nM de uma concentração conhecida de vermelho de fenol diluída em 0,1 N NaOH. Após a determinação do coeficiente linear (α) da curva padrão, a concentração da solução ($C=D.O.$) e a quantidade de fenol vermelho (m) por cada segmento ($m=C \times \text{volume}$) foram determinados. A retenção em cada segmento (x) foi expressa pela % de acordo com a seguinte fórmula: Retenção de corante em cada segmento $x = (\text{quantidade de fenol vermelho em cada segmento} / \text{total de fenol vermelho em todos os 04 segmentos})$.

5.3.10. Avaliação do transporte ileal de água e eletrólitos

Após jejum de 24 horas com livre acesso à Solução de Reidratação Oral (SRO) cloreto de sódio 2,6 g (65 mmol de sódio), glicose anidra 13,5 g (75 mmol de glicose), cloreto de potássio 1,5 g (20 mmol de potássio e 65 mmol de cloreto), citrato de sódio diidratado 2,9 g (10 mmol de citrato), os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (90mg/kg/16mg/kg, i.p). A seguir foram submetidos à laparotomia mediana de aproximadamente 5cm para visualização das vísceras. Após o isolamento de um segmento terminal do íleo (10cm), cânulas de polivinil (OD=0,2cm e OI=0,1cm) foram introduzidas em suas extremidades proximal e distal, mediante criação de fístulas. As fístulas foram ocluídas por meio de ligadura obstrutiva com fios cirúrgicos (algodão 3.0) e as cânulas fixadas mediante ligaduras formando, entre as cânulas e o segmento isolado, o circuito a ser perfundido (Lima, 2002).

Após a cirurgia, foi iniciada a perfusão mediante conexão da cânula proximal a uma bomba do tipo peristáltica (Mini-pump variable flow, Control Company, Edgewood Friendswood, TX, USA) promovendo fluxo de 0.14 mL/min, com solução de Tyrode sem glicose (NaCl 8,0g/L; KCl 0,35g/L; MgCl₂ 0,1g/L; CaCl₂ 0,2g/L; NaHCO₃ 1g/L; NaH₂PO₄ 0,05g/L e, ainda, vermelho de Fenol 0,05 mg/mL, como marcador não absorvível). O líquido perfusor foi mantido aquecido em banho-maria a 37 °C.

Após estabilização de fluxo luminal, o perfusato foi coletado em tubos de ensaio a cada 20 min, durante 60 min de perfusão total (amostras T₂₀, T₄₀ e T₆₀). O volume de cada amostra foi medido. Ao final do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o segmento ileal perfundido retirado, sendo imediatamente pesado (peso úmido). Novas medições de peso desses segmentos

foram realizadas após os mesmos serem mantidos em estufa sob 100 °C por 48h, de modo a permitir a correção dos parâmetros funcionais (peso seco).

Alíquotas da solução perfusora foram obtidas no início e no final de cada experimento para determinação dos parâmetros controle. Foram determinadas as diferenças entre as amostras controle e as coletas do perfusato quanto aos valores de concentrações de sódio, potássio e cloreto (mEq/L) e Vermelho de Fenol.

As dosagens das concentrações de sódio e potássio e cloretos no perfusato por análise em íon seletivo (Roche-Brasil). O método de colorimetria foi empregado para determinação de água (Labtest Bio. Diagnósticos; Belo Horizonte, MG, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

Diferenças entre os valores das concentrações de Na^+ , K^+ e Cl^- foram utilizadas para calcular a taxa de transporte ileal de eletrólitos. Já diferenças entre as concentrações de vermelho de fenol foram empregadas para avaliar a taxa de secreção/absorção de água pelo segmento perfundido. Os parâmetros, de secreção ou absorção dos eletrólitos ou da água, foram corrigidos pelo tempo e pela massa do segmento ileal perfundido, de acordo com o descrito por Lima (2002).

5.3.11. Avaliação da Permeabilidade Intestinal

As secções de mucosa ileal foram montadas em uma câmara de difusão para medir a permeabilidade à fluoresceína (376 Da, 1 mg/ml, diluída em KHBB, pH 7,4) (27). Após um período de estabilização com KHBB (pH 7,4, 30 min), as soluções no lado luminal foram substituídas por uma solução contendo o marcador fluorescente. Uma amostra (100µl) foi retirada do lado seroso em intervalos (0, 30, 60, 90 e 120) durante 2h. O marcador fluorescente foi medido utilizando um leitor de placas de fluorescência (FLUOstar Omega; BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha). Os valores de fluorescência foram expressos a partir de uma curva padrão feitos para cada análise (VANUYTSEL, *et al.*, 2014).

5.3.12. Avaliação da Resistência Elétrica Transepitelial (TEER)

Segmentos do íleo foram montados em câmaras de Ussing (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Alemanha) sem remoção da camada seromuscular, com área exposta de 0,096 cm². As camadas mucosa e serosa foram preenchidas com tampão de bicarbonato de Krebs-Ringer, suplementado com manitol 10 mM e glicose 10 mM, respectivamente. As soluções foram mantidas a 37 °C e gasificadas com carbogênio. A diferença do potencial transmucoso foi continuamente monitorada usando eletrodos Ag/AgCl. A resistência elétrica transepitelial (TEER) foi calculada de acordo com a lei de Ohm a partir das deflexões de tensão induzidas por pulsos de corrente bipolar de 50 mA a cada 60 s com uma duração de 200 ms. Os valores TEER foram registrados para cada tecido a intervalos de 30 min. A TEER média entre 90 e 120 minutos foi calculada para cada grupo experimental. Estes tempos foram selecionados porque um platô TEER estável é alcançado, na maioria dos tecidos, entre 90 e 120 minutos após a montagem (VANUYTSEL, *et al.*, 2014)

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média \pm EPM (variáveis com distribuição normal) ou como mediana \pm mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal). A análise estatística foi feita usando o teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni quando apropriado. “*Mann-Whitney*” foi utilizado para o cálculo da mediana dos escores histopatológicos. Significância estatística foi observada quando $P < 0,05$. Para realização dos testes estatísticos utilizamos o software Prisma versão 5.03 da GraphPad Software.

7. RESULTADOS

7.1. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre a perda de peso induzida por 5-FU em camundongos Swiss

O tratamento com 5-FU promoveu intensa perda de peso nos animais ao longo do estudo, sendo o menor peso registrado no último dia ($72,57 \pm 1,4\%$) quando comparados aos animais do grupo controle que apresentaram ganho de peso, mostrando-se maior no 3º dia ($107,2 \pm 0,84\%$). O tratamento com *B. clausii* + 5-FU preveniu a perda de peso nos animais tratados com 5-FU, embora estes resultados fossem menores quando comparados aos animais controle ($95,15 \pm 1,27\%$). Ainda, observou-se que o tratamento com *B. clausii* de forma isolada não apresentou diferenças significativas quando comparados aos animais do grupo controle ($105,7 \pm 1,56\%$) mostrando um ganho real de peso nesses animais (figura 10).

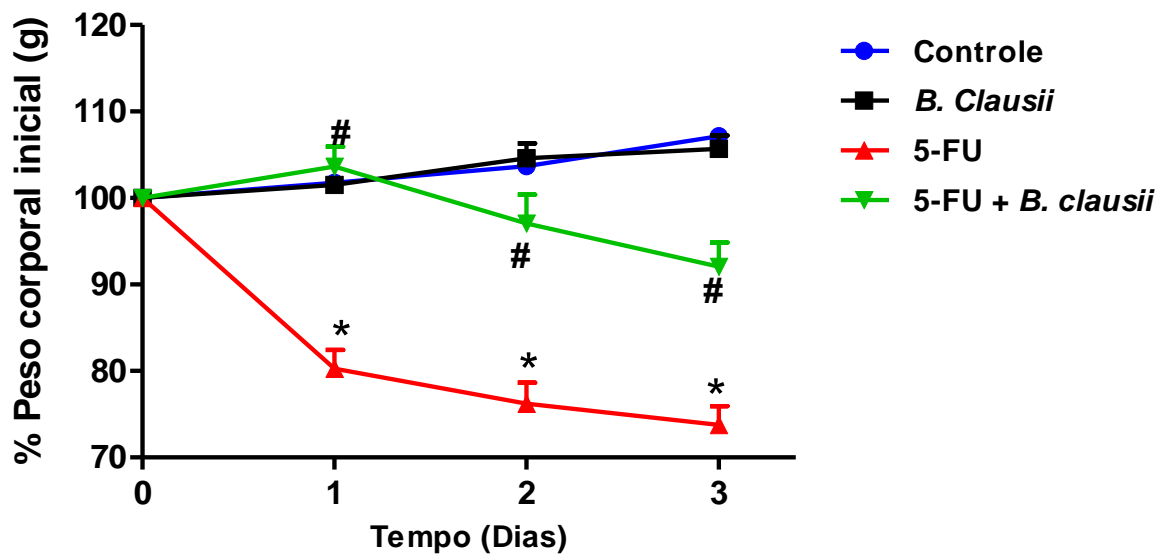


FIGURA 10 - CURVA PONDERAL (%) EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM *Bacillus clausii* NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU. Os animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450 mg/kg i.p.) ou *B. clausii* + 5-FU (2,5 ml/dia, 3 dias, n=7). Os animais foram pesados todos os dias para aferição da perda ou ganho de peso. Os valores representam perda ou ganho de peso comparados ao dia 0 (100% peso aferido) e avaliados durante 3 dias.*P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni.

7.2. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre a leucopenia induzida por 5-FU em camundongos Swiss

O tratamento com 5-FU induziu intensa leucopenia nos animais ($912,5 \pm 96,25/\text{mm}^3$) quando comparados aos animais controle ($4394 \pm 182,6/\text{mm}^3$). O tratamento com *B. clausii* não apresentou diferenças significativas em relação aos animais controle ($4256 \pm 136,7/\text{mm}^3$). Por sua vez, o tratamento com *B. clausii* + 5-FU não reverteu a leucopenia quando comparados aos animais que receberam apenas 5-FU ($1339 \pm 399,8/\text{mm}^3$) (figura 11 A).

Um dos efeitos do 5-FU é promover neutropenia como é demonstrado na figura 11B. O tratamento com 5-FU reduziu o número de neutrófilos ($152,1 \pm 29,69/\text{mm}^3$) quando comparados aos animais do grupo controle ($548,3 \pm 97,93/\text{mm}^3$). O tratamento com *B. Clausii* aumentou o número de neutrófilos ($363,1 \pm 57,41/\text{mm}^3$) quando comparado ao grupo *B. clausii* + 5-FU ($314,7 \pm 76,77/\text{mm}^3$).

Em relação ao número de monócitos, o tratamento com 5-FU reduziu ($32,63 \pm 7,171/\text{mm}^3$) o número de células comparado aos animais do grupo controle ($75,56 \pm 28,91$). O tratamento dos animais com *B. clausii* ($46,38 \pm 14,86/\text{mm}^3$) não apresentou diferença estatística quando comparado aos animais *B. clausii* + 5-FU ($64,67 \pm 16,63/\text{mm}^3$) (figura 11 C).

Na figura 11 D, pode-se observar que o tratamento com 5-FU ($356,3 \pm 40,04/\text{mm}^3$) reduziu o número de linfócitos quando comparados aos animais controle ($2245 \pm 192,8/\text{mm}^3$). Já o tratamento *B. clausii* + 5-FU ($920,7 \pm 88,77/\text{mm}^3$) aumentou o número de linfócitos comparado aos animais tratados apenas com 5-FU.

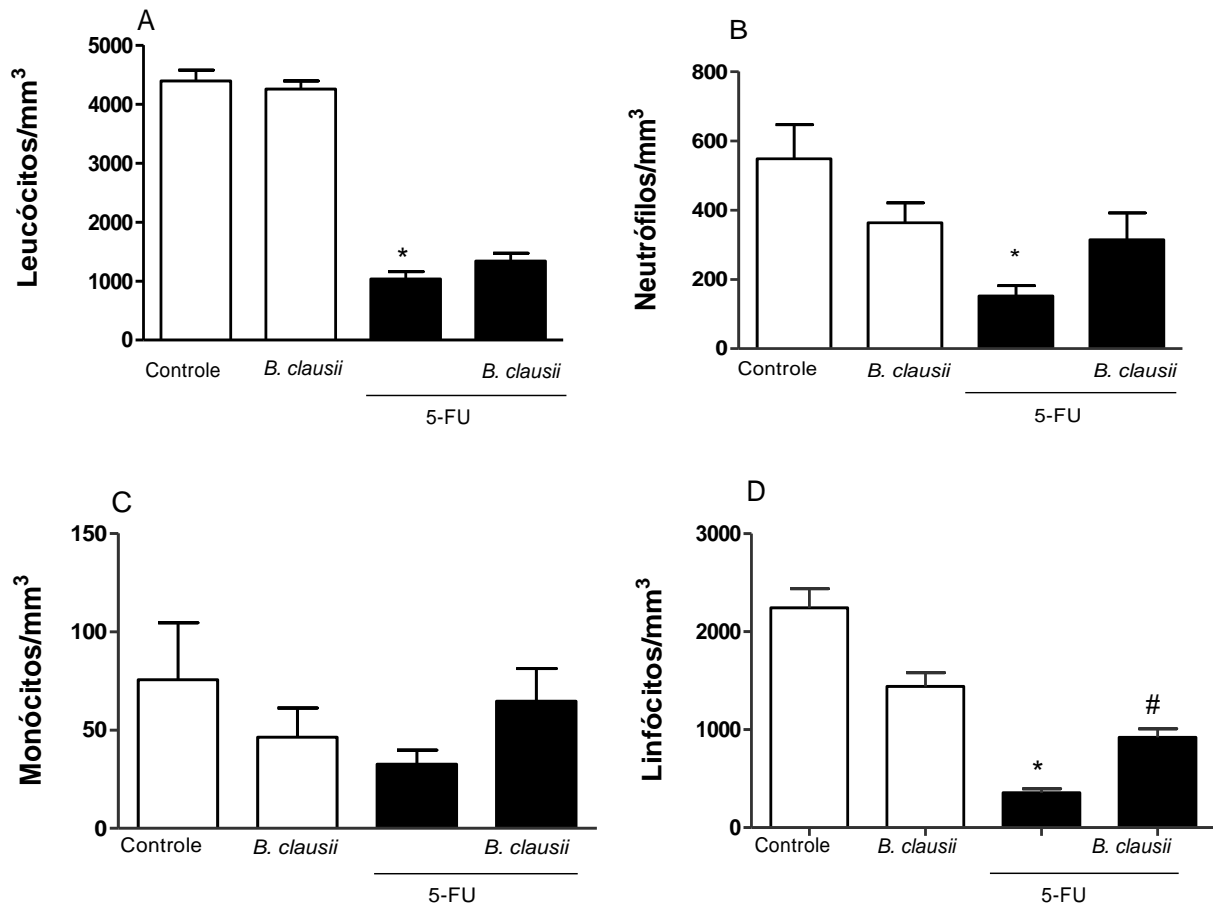


FIGURA 11 - CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM *B. clausii* NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU. Os animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450mg/kg i.p.) ou com *B. clausii* + 5-FU (2,5ml /dia, 3 dias, n=7). Os valores representam a contagem através de esfregaço avaliado no 3º dia de tratamento.*P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni

7.3. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre os parâmetros de Histopatologia e Morfometria Intestinal

Os animais tratados com 5-FU tiveram alterações histopatológicas no duodeno, jejuno e íleo: mucosa com vilosidades encurtadas com vacuolado de células, infiltrado inflamatório intenso e vacuolização (figura 12, A, B e C) quando comparados aos animais do grupo controle. Já em relação aos animais tratados com *B. clausii* não houve alterações histológicas significativas nos segmentos intestinais, sendo semelhantes aos animais controle. No entanto, o tratamento *B. clausii* + 5-FU, reduziu os efeitos do 5-FU sobre a mucosa intestinal no duodeno, jejuno e íleo.

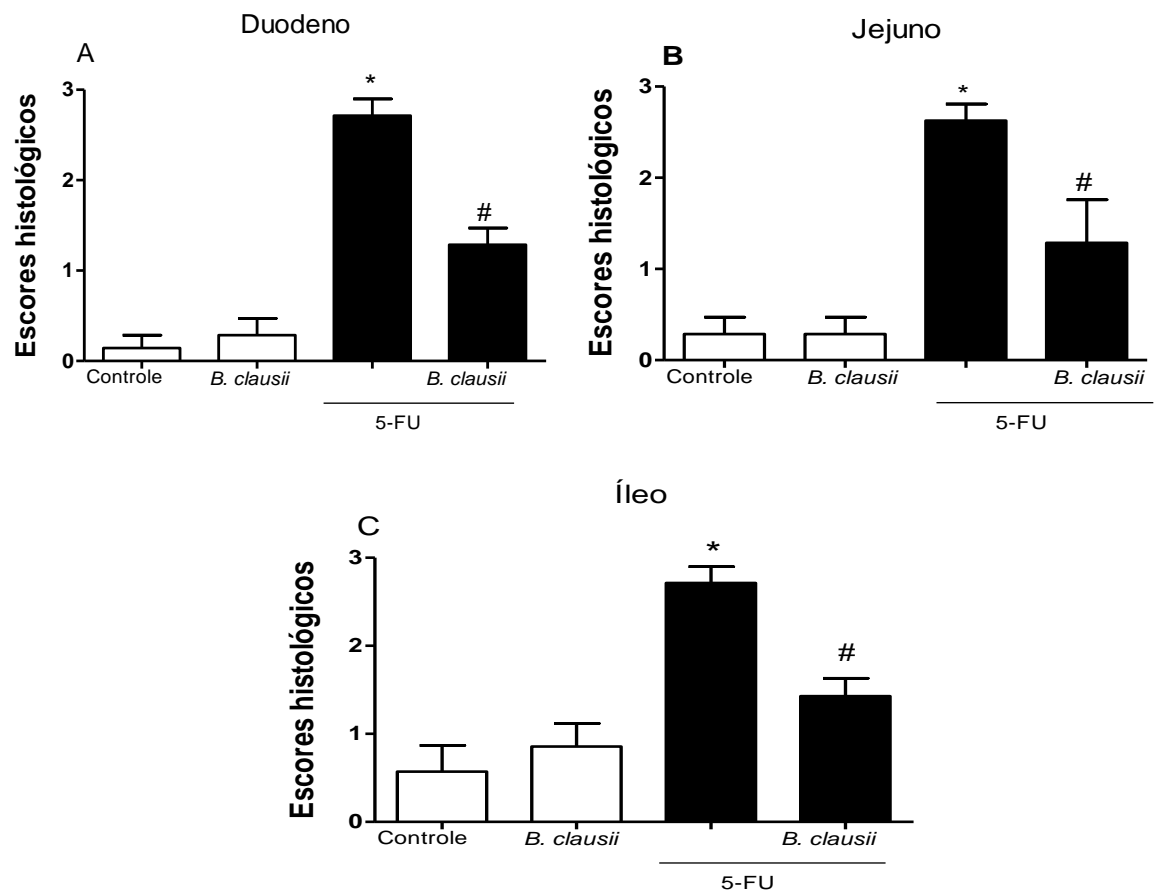


FIGURA 12 - ESCORES HISTOPATOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM *B. clausii* NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR (5-FU). Os animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450 mg/kg i.p.) ou com *B. clausii* + 5-FU (2,5 ml/dia, 3 dias, n=7). A-duodeno; B-jejuno, C-íleo. *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni

A figura 13 apresenta as fotomicrografias dos segmentos intestinais duodeno (A, B e C), jejuno (D, E e F) e íleo (G, H e I), respectivamente. Animais tratados com 5-FU apresentam encurtamento dos vilos e aumento da profundidade das criptas quando comparados aos animais controle. Já o tratamento com *B. clausii* + 5-FU é capaz de restaurar a integridade da mucosa intestinal fazendo com que ocorra uma diminuição da profundidade das criptas e uma renovação dos vilos em todos os segmentos estudados.

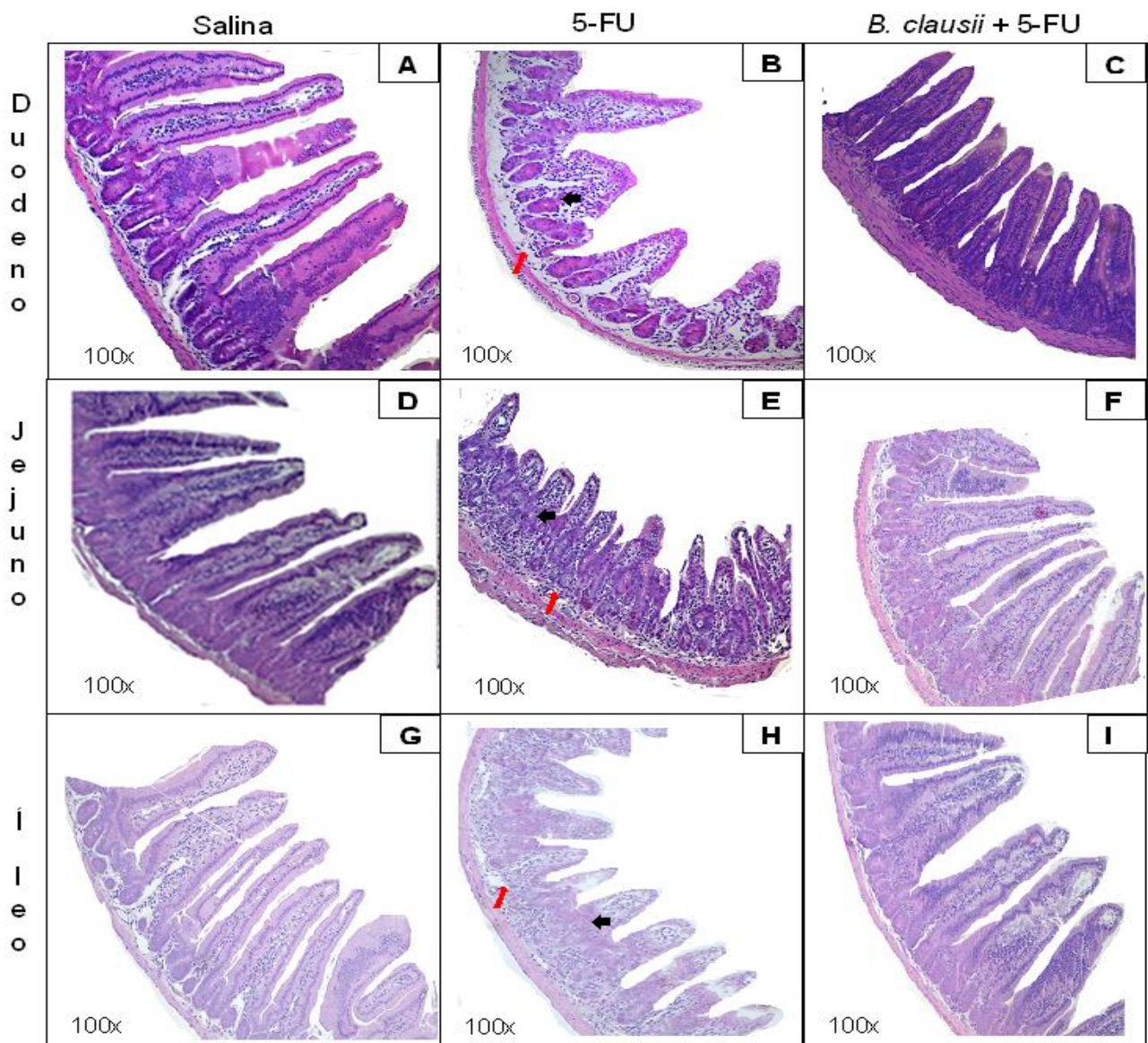


FIGURA 13 - Fotomicrografias de duodeno, jejuno e íleo de camundongos controle (A- D-G), e submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU (B-E-H) e tratados com *B. clausii* + 5-FU (C-F-I). Animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450 mg/kg i.p.) ou com *B. clausii* + 5-FU (2,5 ml/dia, 3 dias, n=7). (A-B-C) duodeno; (D-E-F) jejuno e (G-H-I) íleo. (→ edema e vacuolização
 ■ infiltrado neutrofílico).

Ao analisarmos a figura 14 (painel A, B e C) podemos observar a histomorfometria das vilosidades intestinais dos camundongos submetidos à mucosite intestinal por 5-FU. Como se observa na figura 14 A, o tratamento com 5-FU provoca diminuição do comprimento do vilo tanto no duodeno quanto no jejuno e no íleo quando comparados aos animais do grupo controle. No entanto, em relação aos animais tratados com *B. clausii* + 5-FU pode-se observar que o tratamento é capaz de prevenir a diminuição do comprimento das vilosidades intestinais no duodeno, jejuno e no íleo quando comparados aos animais tratados somente com 5-FU.

Ainda analisando a figura 14 (painel B) podemos observar a histomorfometria das criptas intestinais onde se pode constatar que o tratamento com 5-FU provoca aumento da profundidade das criptas quando comparados aos animais do grupo controle. No entanto, em relação aos animais tratados com *B. Clausii* + 5-FU pode-se observar que o tratamento previne o aumento da profundidade das criptas quando comparados aos animais tratados somente com 5-FU.

Na figura 14 (Painel C) pode ser observada a relação vilo/cripta onde o tratamento com 5-FU promove lesões que comprovam que há um desbalanço entre o comprimento do vilo e a profundidade da cripta quando comparados aos animais controle e o uso de *B. clausii* + 5-FU previne as alterações desses parâmetros quando comparados aos animais tratados somente com 5-FU.

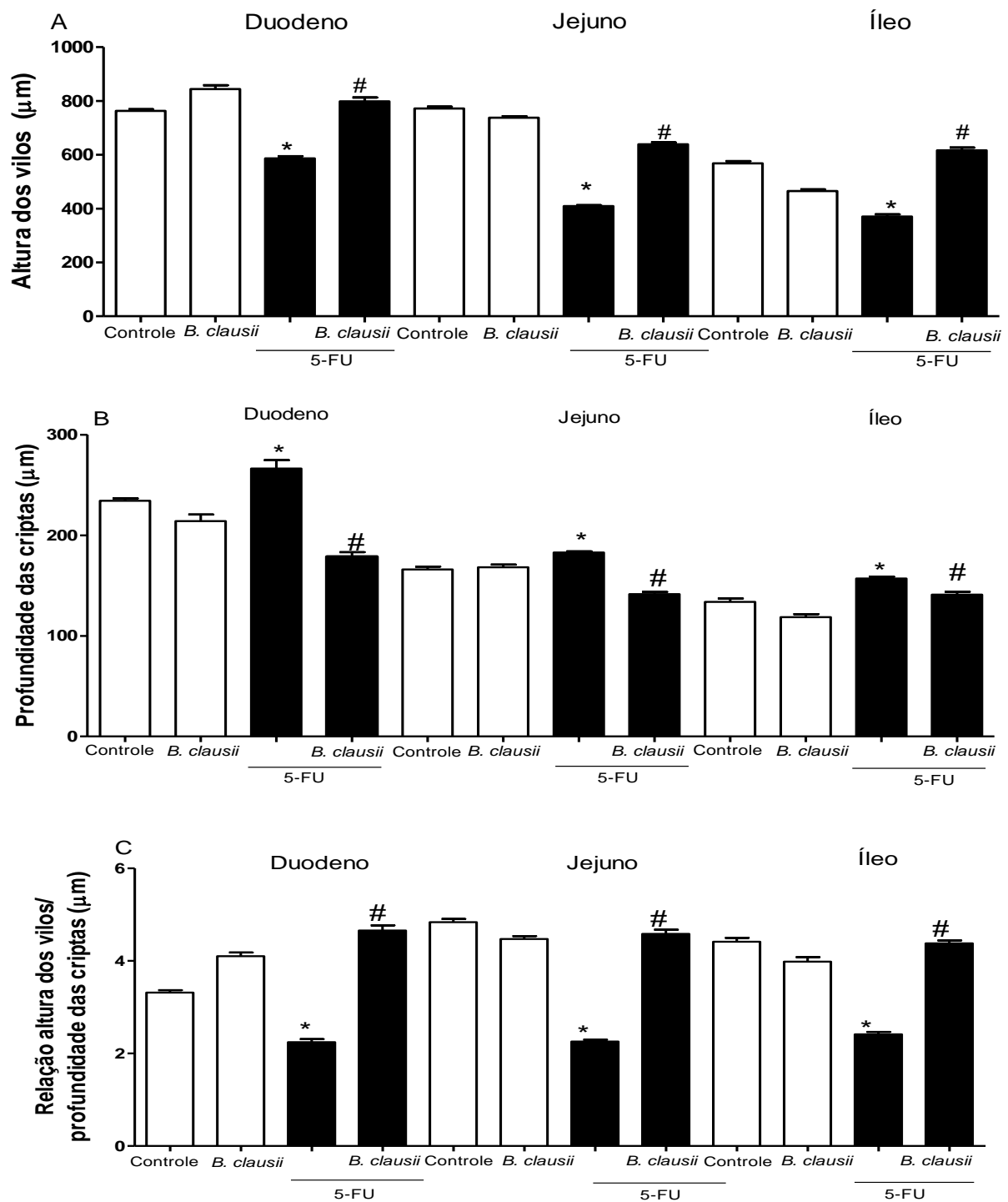


FIGURA 14 - Análise morfométrica dos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo 5-FU e tratados com *B. clausii*. Os animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450 mg/kg i.p.) ou com *B. clausii* + 5-FU (2,5 ml/dia, 3 dias, n=7). Altura dos vilos (painel A), profundidade das criptas (painel B) e a razão vilosidade/cripta (painel c). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferroni

7.4. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre a atividade de MPO, ensaio de Glutaciona e concentrações de Malonaldeído

Após a administração de 5-FU, os animais apresentaram aumento significativo na infiltração de neutrófilos no duodeno ($14,59 \pm 1,31$ UMPO/mg) jejuno ($17,13 \pm 1,44$ UMPO/mg) e íleo ($11,35 \pm 2,28$ UMPO/mg) respectivamente, em comparação ao grupo controle, duodeno ($2,34 \pm 0,55$ UMPO/mg), jejuno ($1,84 \pm 0,50$ UMPO/mg) e íleo ($1,62 \pm 0,48$ UMPO/mg). Tratamento com *B. clausii* + 5-FU reduziu a infiltração de neutrófilos no duodeno ($3,43 \pm 0,98$ UMPO/mg), no jejuno ($2,84 \pm 0,88$ UMPO/mg) e no íleo ($3,92 \pm 0,64$ UMPO/mg) quando em comparados aos animais que receberam somente 5-FU figura 15 (painel A, B e C).

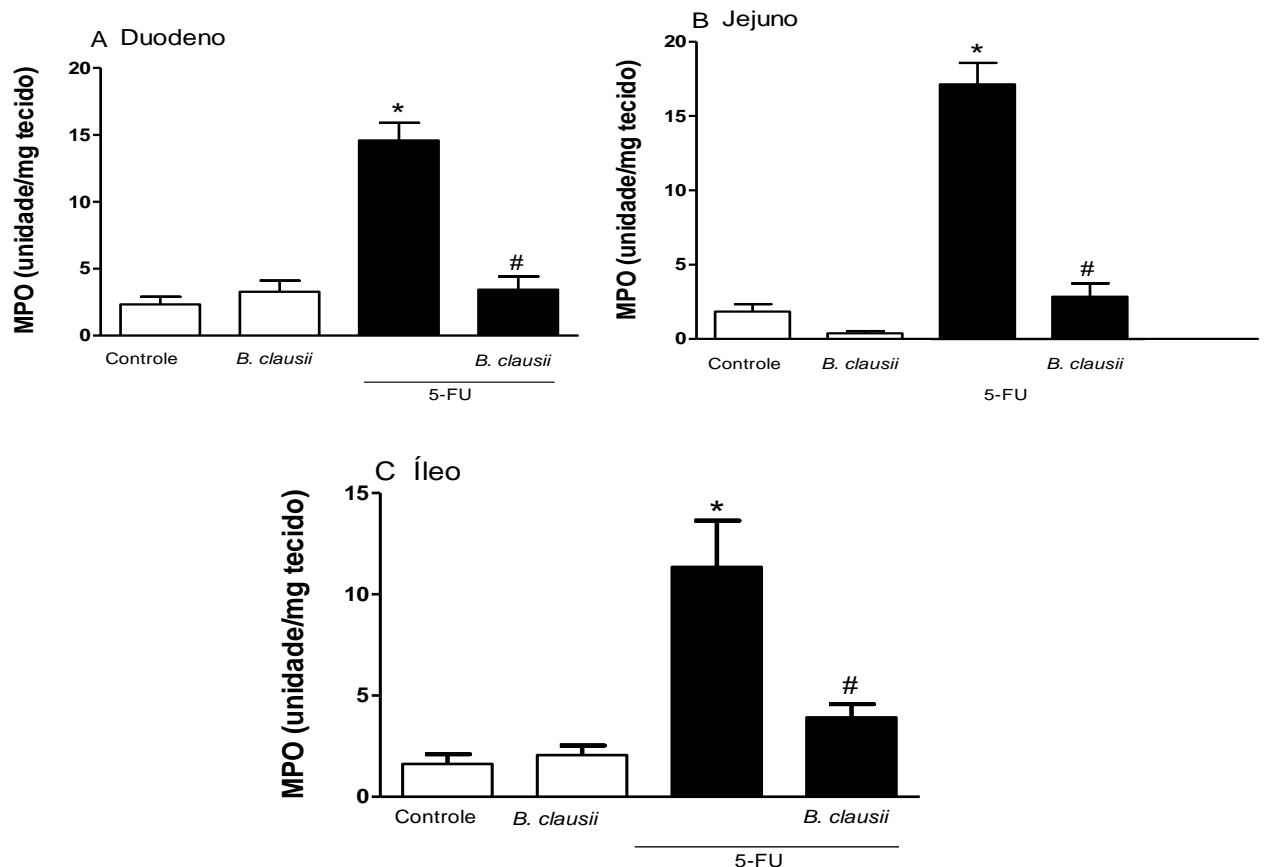


FIGURA 15 - Efeito do *B. clausii* sobre o infiltrado neutrofílico no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Os animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450 mg/kg i.p.) ou com *B. clausii* + 5-FU (2,5 ml/dia, 3 dias, n=7). Segmentos de duodeno (painel A) jejuno (painel B) e íleo (painel C) foram utilizados para a realização de ensaio da atividade de MPO. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni.

Ao se observar a figura 16, percebe-se que o tratamento com 5-FU induziu significativa redução da concentração de GSH no duodeno ($198,5 \pm 8,394 \mu\text{g}/\text{mg}$), jejuno ($185,2 \pm 15,01 \mu\text{g}/\text{mg}$) e de maneira mais intensa no íleo ($93,19 \pm 17,82 \mu\text{g}/\text{mg}$) em comparação ao grupo controle, duodeno ($383,3 \pm 65,09 \mu\text{g}/\text{mg}$), jejuno ($477,1 \pm 58,33 \mu\text{g}/\text{mg}$) e íleo ($312,6 \pm 30,44 \mu\text{g}/\text{mg}$) respectivamente. No entanto, o tratamento com *B. clausii* + 5-FU aumentou os valores de GSH no duodeno ($383,4 \pm 25,96 \mu\text{g}/\text{mg}$), jejuno ($523,9 \pm 46,54 \mu\text{g}/\text{mg}$) e íleo ($258,8 \pm 33,08 \mu\text{g}/\text{mg}$), figura 16 (A, B e C) quando comparado aos animais que receberam somente 5-FU.

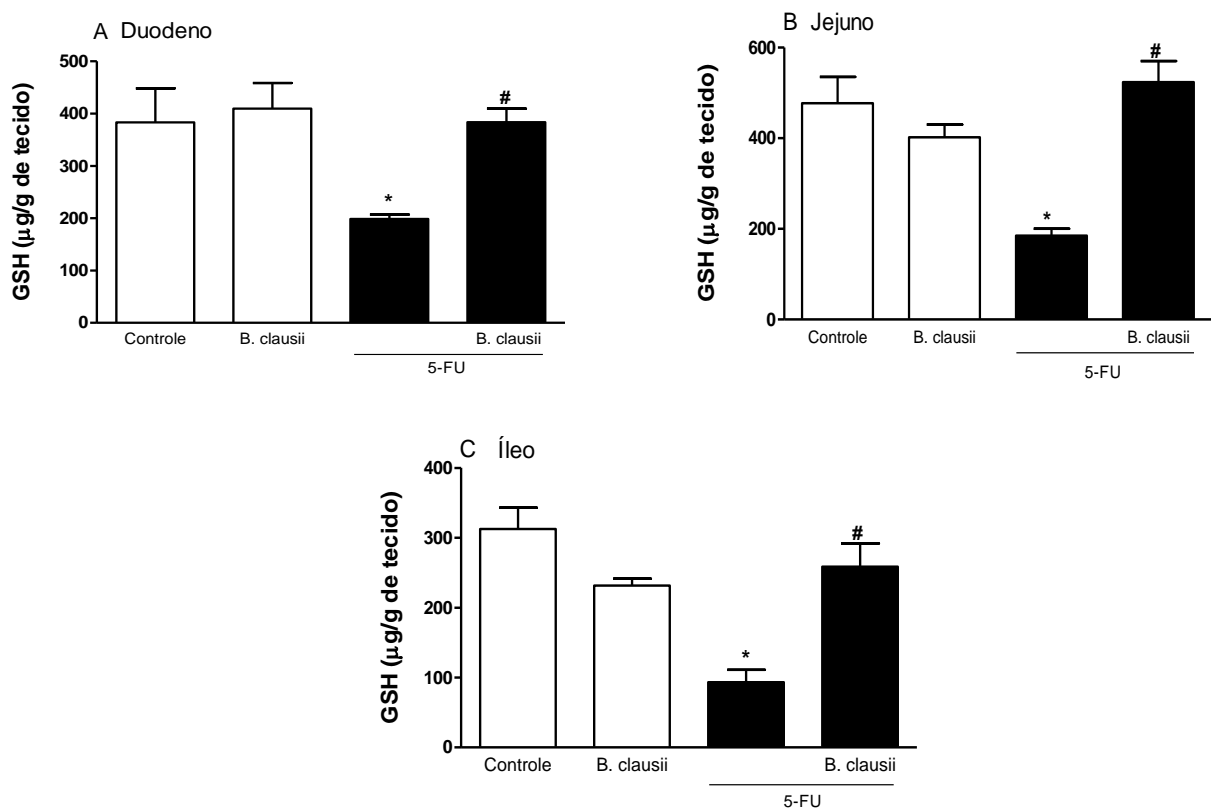


FIGURA 16 - Efeito do *B. clausii* sobre a concentração de GSH nos segmentos intestinais no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Os animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450 mg/kg i.p.) ou com *B. clausii*+ 5-FU (2,5 ml/dia, 3 dias, n=7). Segmentos de duodeno (painel A), jejuno (painel B) e íleo (painel C) foram utilizados para aferir as concentrações de GSH. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni.

A figura 17 mostra que o tratamento com 5-FU aumentou as concentrações de MDA no jejuno ($118,7 \pm 4,582$ nmol/g de tecido) e íleo ($128,5 \pm 11,03$ nmol/g de tecido) respectivamente, quando comparados ao controle, jejuno ($90,09 \pm 8,23$ nmol/g de tecido) e íleo ($62,09 \pm 5,79$ nmol/g de tecido). O tratamento com *B. clausii* + 5-FU diminuiu as concentrações nos dois segmentos avaliados: jejuno e íleo ($95,71 \pm 5,340$ nmol/g de tecido e $87,11 \pm 4,833$ nmol/g de tecido, respectivamente) quando comparados aos animais tratados somente com 5-FU.

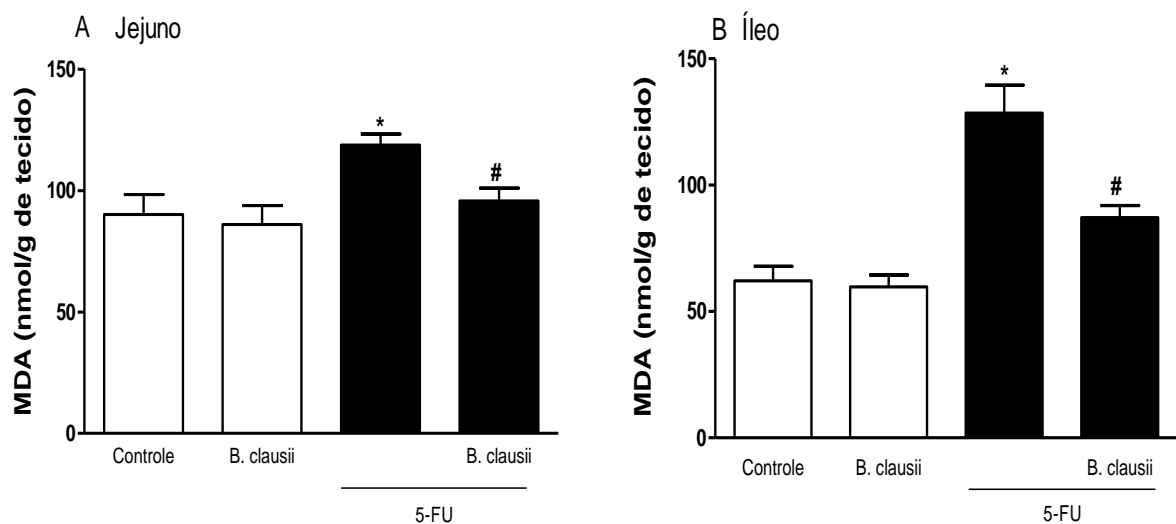


FIGURA 17 - Efeito do *B. clausii* sobre a concentração de MDA nos segmentos intestinais no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Os animais foram tratados com salina 0,9% ou 5-FU (450 mg/kg i.p.) ou com *B. clausii* + 5-FU (2,5 ml/dia, 3 dias, n=7). Segmentos de jejuno (painel A) e íleo (painel B) foram utilizados para aferir as concentrações de MDA. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni

7.5. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre o esvaziamento gástrico e trânsito intestinal

A figura 18 A mostra que os valores de retenção gástrica foram significativamente maiores nos animais tratados com 5-FU ($41,34 \pm 1,82\%$) quando comparado aos animais controle ($25,11 \pm 4,84\%$) (Figura 17 A). Observou-se que o tratamento com *B. clausii* + 5-FU ($25,36 \pm 1,30\%$) faz com que os valores de retenção

retorne aos valores normais quando comparados aos animais que receberam apenas 5-FU. O painel B mostra a retenção intestinal. Observa-se que o tratamento com *B. clausii* + 5-FU promove diminuição da retenção na região proximal e aumento da retenção na porção medial, e na porção distal não houve diferenças de retenção significativas quando comparados aos animais tratados somente com 5-FU.

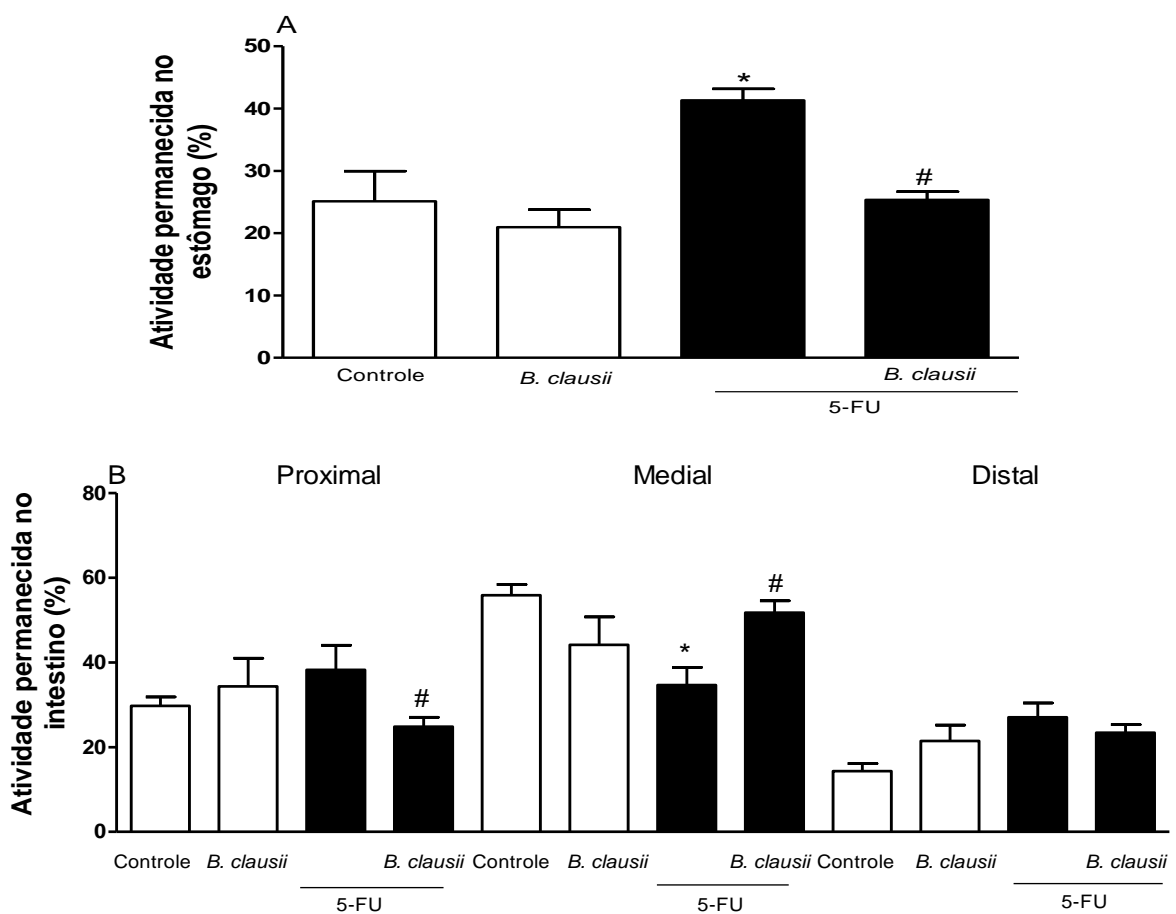


FIGURA 18 - Efeito do *B. clausii* sobre o esvaziamento gástrico e transito gastrintestinal no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Atividade remanescente no estômago (A) e segmentos intestinais (Proximal, Medial e Distal). 20 min após a gavagem de solução de fenol vermelho (0,75 mg/mL em 5% de glicose). Os valores foram expressos como porcentagem da atividade total no trato gastrintestinal e como média \pm E.P.M. *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni.

7.6. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre o Transporte intestinal de água e eletrólitos e contratilidade intestinal

A figura 19 resume os resultados do transporte intestinal de água e eletrólitos em camundongos submetidos à mucosite intestinal por 5-FU. Observou-se que o tratamento com 5-FU aumenta a secreção de H₂O, Na⁺, K⁺ e Cl⁻, quando comparados aos animais do grupo controle (-0,087±0,009 vs 0,057±0,012 ml/g/min; -15,98±0,927 vs 26,34±3,588 μEq/g/min; -0,130±0,169 vs 0,642±0,115 μEq/g/min; -14,12±2,029 vs 19,06±3,932 μEq/g/min, respectivamente). Já o tratamento com *B. clausii* + 5-FU reverte os valores de secreção apresentados nos animais que receberam o tratamento somente com 5-FU, aumentando a absorção de H₂O (0,068±0,018 ml/g/min;), Na⁺ (25,12±4,753 μEq/g/min), K⁺ (0,272±0,098 μEq/g/min) e Cl⁻ (10,35± 3,464μEq/g/min), figura 19 (painel A, B, C e D).

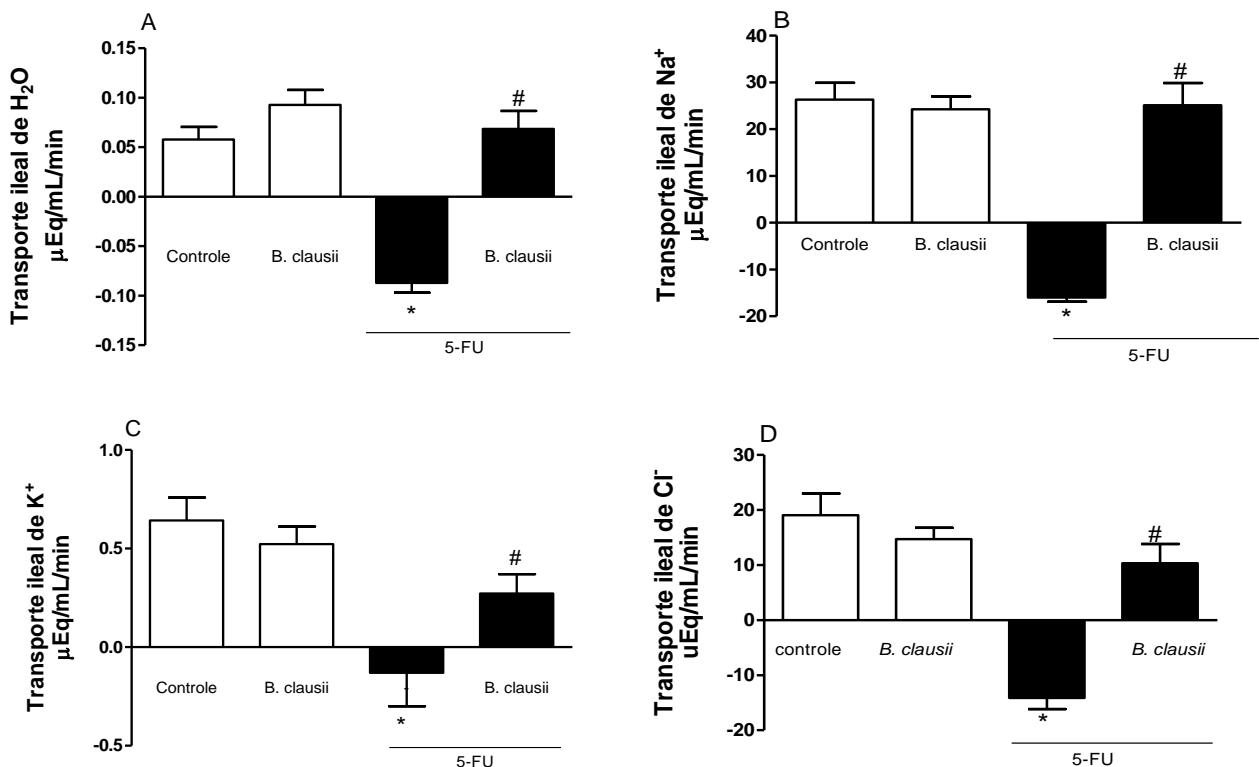


FIGURA 19 - Efeito do *B. clausii* sobre o transporte intestinal de água e eletrólitos no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Os animais anestesiados foram tratados (i.p) tiveram o íleo terminal perfundido com solução de Tyrode com vermelho de fenol (VF) (0,05 mg/ml) ao longo de 60 min. Os valores foram expressos em média ± E.P.M de secreção (valores negativos) ou absorção (valores positivos) *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni

Ao avaliar a atividade mecânica do músculo liso gastrointestinal, observou-se hipercontractilidade induzida por 5-FU no músculo jejunal e ileal dos animais submetidos à mucosite intestinal quando estimulada pelo carbacol em concentrações cumulativas (10^{-10} - 10^{-4} mM) (fig. 20 A e B). Os valores representam a média da concentração com maior contração de carbacol (10^{-4} CCh).

Na figura 20 A pode-se observar que os animais tratados com 5-FU apresentam maiores respostas contráteis (hipercontractilidade) no jejuno quando comparados ao grupo controle, respectivamente ($0,771 \pm 0,095$ vs $0,323 \pm 0,083$ g). No entanto, quando se observa a mesma figura, os animais tratados com *B. clausii* + 5-FU apresentam diminuição dos valores de contração quando comparados ao que grupo que recebeu somente 5-FU, respectivamente ($0,771 \pm 0,095$ vs $0,338 \pm 0,045$ g).

A figura 20 B mostra que os animais tratados com 5-FU apresentam maiores respostas contráteis (hipercontractilidade) no íleo em relação ao grupo controle, respectivamente ($1,416 \pm 0,067$ vs $0,591 \pm 0,043$ g). *B. clausii* + 5-FU diminui os valores de contração quando comparados ao grupo que recebeu somente 5-FU, respectivamente ($1,416 \pm 0,067$ vs $0,526 \pm 0,077$ g).

Ao avaliar a resposta contrátil ao Campo de Estimulação Elétrica observou-se que ocorre a hipercontractilidade induzida por 5-FU no músculo liso jejunal e ileal.

Na padronização de ΔG jejunal (fig. 20 C), mostrou hipercontractilidade no grupo tratado com 5-FU tanto com o estímulo de 20 V quanto com o estímulo de 40 volts quando comparado ao grupo controle, respectivamente (20V: $0,651 \pm 0,057$ vs $0,195 \pm 0,023$ g) (40V: $0,982 \pm 0,031$ vs $0,347 \pm 0,050$ g). O tratamento com *B. clausii* + 5-FU diminuiu os valores de contração quando comparados ao grupo que recebeu somente 5-FU, em estímulo de 20V e 40 volts, respectivamente (20V: $0,651 \pm 0,057$ vs $0,176 \pm 0,032$ g) (40V: $0,982 \pm 0,031$ vs $0,458 \pm 0,048$ g).

A figura 20 D mostra que o íleo mostrou hipercontractilidade no grupo de 5-FU tanto com o estímulo de 20 V quanto com o estímulo de 40 volts comparado ao grupo controle, respectivamente (20V: $0,794 \pm 0,028$ vs $0,312 \pm 0,033$ g), (40V: $1,013 \pm 0,040$ vs $0,4550 \pm 0,040$ g). O tratamento com *B. clausii* + 5-FU, diminuiu os valores de contração quando comparados ao grupo que recebeu somente 5-FU,

tanto no estímulo de 20 V quanto no de 40 volts, respectivamente (20V:0,794±0,028 vs 0,223±0,024 g) (40V:1,013±0,040 vs 0,400±0,048 g).

Da mesma forma, os dados da figura 20 E mostram que as respostas contráteis com estímulos na frequência 4Hz no jeuno são maiores em animais tratados com 5FU (0,543±0,063 vs 0,271±0,031 g) quando comparados ao grupo controle e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU diminuiu esses valores (0,193±0,024 vs 0,543±0,063 g) quando comparado ao grupo que recebeu somente 5-FU. Da mesma forma, os valores das respostas contráteis com estímulos na frequência de 8Hz são aumentados em animais tratados com 5FU (0,869±0,058 versus 0,332±0,042 g) quando em comparação com o grupo controle e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU diminuiu esses valores (0,458±0,040 vs 0,869±0,058 g) quando comparados ao grupo que recebeu somente 5-FU.

As respostas contráteis com estímulos na frequência 4Hz no íleo (fig. 20 F) são maiores em animais tratados com 5FU (0,585±0,052 vs 0,248±0,047 g) quando comparados ao grupo controle e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU diminuiu esses valores de contração (0,339±0,031 vs 0,585±0,052 g) quando comparado ao grupo que recebeu somente 5-FU. Para a frequência de 8Hz, os animais tratados com 5-FU apresentam valores maiores de contração (0,925±0,085 vs 0,480±0,069 g) quando comparado ao grupo controle e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU diminuiu esses valores (0,434±0,037 vs 0,925±0,085 g) quando comparado ao grupo que recebeu somente 5-FU.

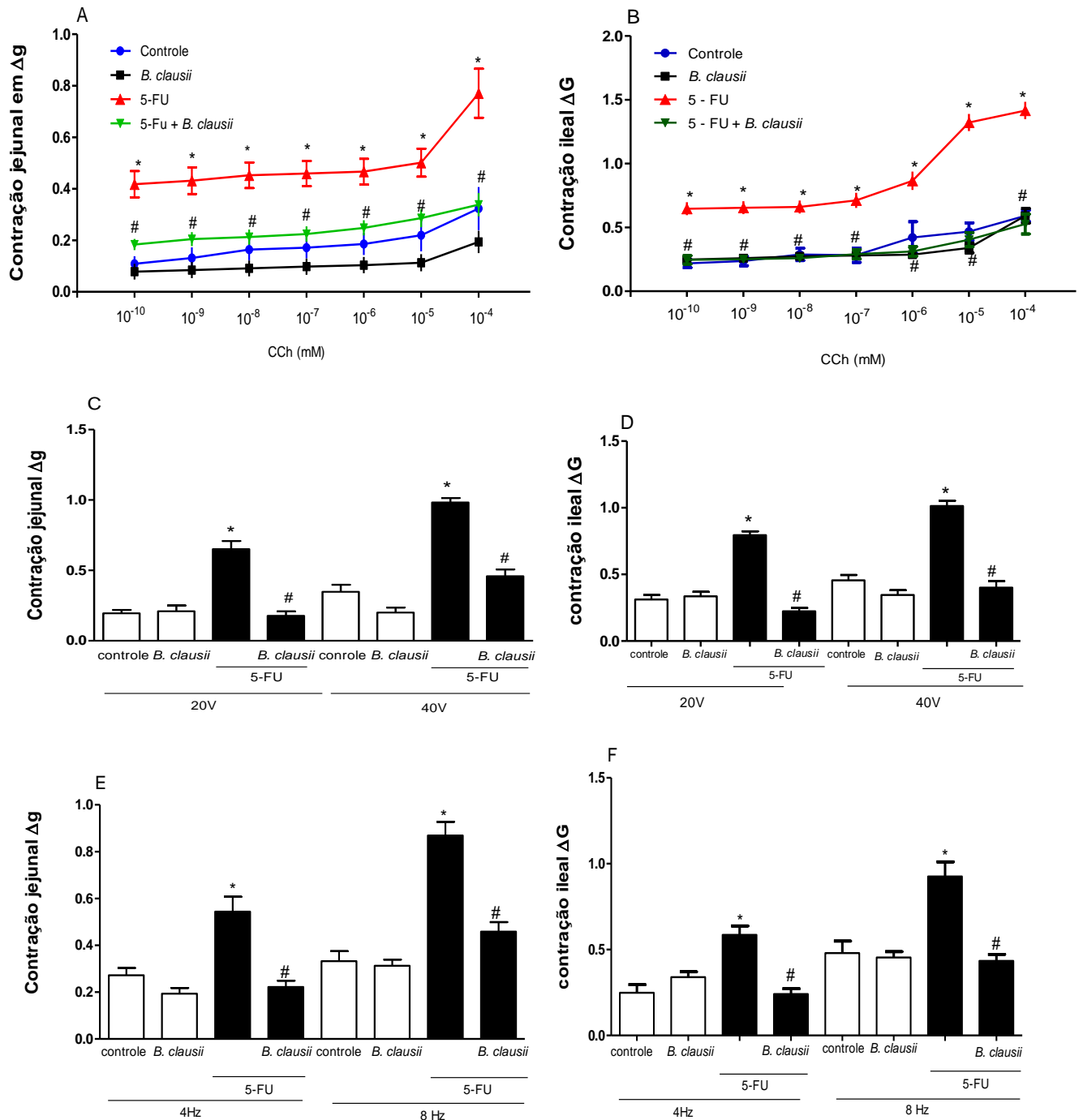


FIGURA 20 - Efeito do *B. clausii* sobre a contractilidade do músculo liso jejunal e ileal no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Os animais anestesiados foram tratados (i.p) tiveram segmentos (0,5 cm) do íleo e do jejunum retirados e submetidos à contractilidade em um sistema de banho de órgãos. Os valores foram expressos em média \pm E.P.M das curvas de CCh no jejunum (painel A) e íleo (painel B). Estimulação elétrica em Voltagem jejunum (painel C) e íleo (painel D) e em Hertz no jejunum (painel E) e íleo (painel F) *P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

7.7. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre a permeabilidade intestinal

Conforme mostrado na figura 21, os animais os animais tratados com 5-FU apresentaram aumento de permeabilidade da mucosa ileal ($P < 0,05$) (3885 ± 1838 vs $1620 \pm 678,8 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, respectivamente) em comparação com o grupo controle e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU diminuiu a permeabilidade (2304 ± 1082 vs $3885 \pm 1838 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$, respectivamente) em comparação com o grupo que recebeu somente 5-FU.

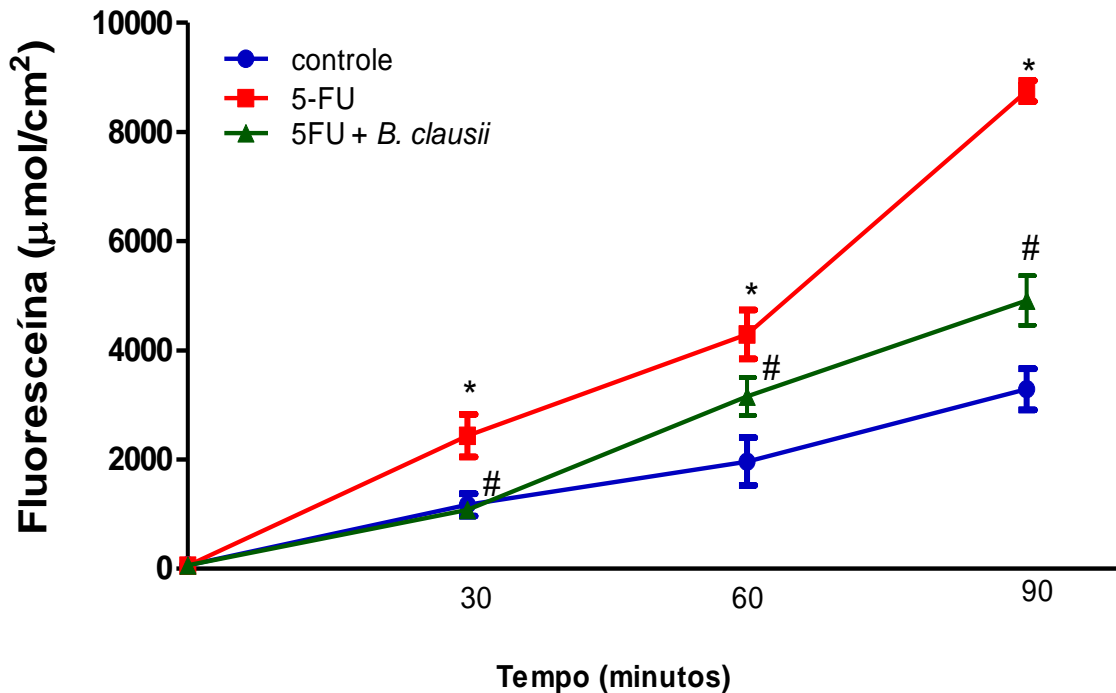


FIGURA 21- Efeito do *B. clausii* sobre a permeabilidade ileal no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Os animais anestesiados foram tratados (i.p) tiveram segmentos (0,5 cm) do íleo retirados e montados em câmaras de Ussing para avaliação da permeabilidade à fluoresceína (376 Da). Os valores foram expressos em média \pm E.P.M.* $P < 0,05$ vs controle e # $P < 0,05$ vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni.

7.8. Efeito do tratamento com *B. clausii* sobre a resistência elétrica transepitelial

Conforme mostrado na figura 22, os animais tratados com 5-FU apresentaram aumento da resistência elétrica transepitelial (TEER) ($36,82 \pm 3,944 \Omega/\text{cm}^2$) ileal significativa aos 90 minutos quando comparada aos animais controle ($28,40 \pm 2,188 \Omega/\text{cm}^2$). O tratamento com *B. clausii* + 5-FU ($34,95 \pm 3,950 \Omega/\text{cm}^2$) não foi capaz de reverter os efeitos do 5-FU sobre a TEER.

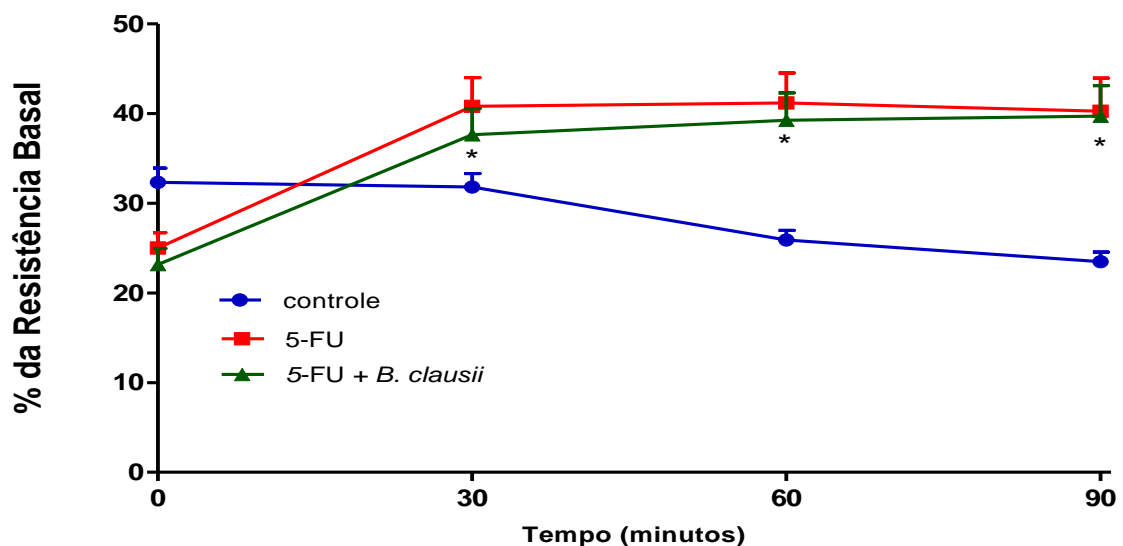


FIGURA 22 - RESISTÊNCIA ELÉTRICA TRANSEPITELIAL (TEER) EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM *B. CLAUSII* ou 5-FU. Os animais anestesiados foram tratados (i.p) tiveram segmentos (0,5 cm) do íleo retirados e montados em câmaras de Ussing para avaliação da TEER O tratamento com *B. clausii* melhorou os parâmetros de permeabilidade dos animais 5-FU. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.*P < 0,05 vs controle e #P < 0,05 vs 5-FU. ANOVA seguida do teste de Bonferoni.

8. DISCUSSÃO

O estudo atual é o primeiro a investigar o efeito do probiótico *Bacillus clausii* (*B. clausii*) na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil (5-FU). Este estudo demonstra que o tratamento com *B. clausii* é capaz de reverter as alterações induzidas por 5-FU que repercute em mucosite intestinal comprometendo a integridade da barreira epitelial funcional, desordens sobre a histomorfometria intestinal e desordens da motilidade gastrointestinal em camundongos.

Para chegarmos a esses resultados utilizamos metodologia de indução de mucosite intestinal já bem caracterizada e utilizada em nosso laboratório, descrita por Soares *et al.* (2008), e observamos as alterações dos parâmetros inflamatórios e funcionais.

A avaliação dos dados demonstra que houve a indução da mucosite, pois no 3º dia após a administração do 5-FU houve alterações tanto de caráter inflamatório quanto funcional, tais como: a perda de peso, aumento da concentração de mieloperoxidase com presença de infiltrado mono e polimorfonucleares, produção de radicais livres (EROS) com consumo de GSH, aumento de MDA, perda da morfometria intestinal com diminuição da relação viilo/cripta e retarde do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal, aumento da secreção intestinal de água e eletrólitos e aumento da permeabilidade intestinal e, ainda, aumento da contratilidade do músculo liso intestinal como também demonstrado na literatura. No entanto, houve aumento da resistência elétrica transepitelial. (SOARES, *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2012; NAKAO *et al.*, 2012; JUSTINO *et al.*, 2014; JUSTINO *et al.*, 2015).

Um dos eventos que acometem pacientes com mucosite intestinal é a perda de peso e diversos autores têm atribuído a redução de peso observada em animais com mucosite induzida por agentes antineoplásicos, entre os quais o 5-FU, a uma diminuição da absorção de alimentos devido às alterações nas vilosidades intestinais e à perda de água e eletrólitos provocada em consequência da diarreia (CARNEIRO *et al.*, 2004; DUNCAN; GRANT, 2003; MELO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013).

Ao se mensurar diariamente a variação de peso dos animais durante os 03 dias experimentais da mucosite intestinal induzida por 5-FU, observou-se que em animais tratados com *B. clausii* + 5-FU houve prevenção da perda de peso embora estes resultados não consigam reproduzir aqueles encontrados no grupo controle e no grupo *B. clausii* de forma isolada.

Outro dado que comprova a mucosite intestinal com o uso de 5-FU é a presença de leucopenia também descrita por diversos autores do grupo LAFICA/LEFFAG (SOARES *et al.*, 2008, 2013; JUSTINO *et al.*, 2014, 2015) e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU não altera a ocorrência da leucopenia demonstrando que esse probiótico não interfere na ação do 5-FU. Esse fato pode ser explicado, possivelmente, devido ao fato de o probiótico exercer suas ações preferencialmente em nível local, pois este probiótico apresenta baixo risco de translocação (LOPETUSO *et al.*, 2016)

Com o intuito de investigar a participação dos neutrófilos no presente estudo, sabendo que estes tem uma importante participação no mecanismo de mucosite intestinal (RIBEIRO *et al.*, 2002), foi aferida a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), por esta ser considerada um importante marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o TGI.

A liberação dessa enzima dos grânulos azurófilos dos neutrófilos 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 (MMPs) e mediadores solúveis da inflamação (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015).

Nesse estudo observou-se que os animais tratados com 5-FU apresentavam níveis maiores de MPO do que os animais controle e o tratamento com *B. clausii* reverteu esses níveis de MPO nos 03 segmentos estudados (duodeno, jejuno e íleo). Dados da literatura demonstram que esse probiótico é capaz de atuar durante o processo inflamatório por seu papel imunomodulador (URDACI *et al.*, 2004; CIPRANDI *et al.*, 2005).

A literatura disponível até este momento demonstra que os achados deste presente estudo estão de acordo com outros autores onde 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

(DUNCAN e GRANT 2003; SONIS *et al.* 2004). Dados recentes atestam que os neutrófilos são 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 (PEREIRA *et al.*, 2016).

Outros parâmetros que comprovam a indução da mucosite intestinal no presente trabalho são a redução do comprimento das vilosidades intestinais, o elevado escore histopatológico da mucosa em todos os segmentos estudados, características também observadas por Ferreira *et al.* (2012).

Um dos efeitos relacionados à mucosite intestinal é a perda da arquitetura intestinal demonstrando que o intestino delgado é especialmente suscetível aos danos causados pelos antimetabólitos como o 5-FU, principalmente pela sua elevada taxa de proliferação (KEEFE *et al* 2007; SOARES *et al* 2008; LOPES, 2014; LEOCÁDIO *et al* 2015) e, outro fato que demonstra as consequências diretas do uso de antineoplásicos é o dano das células epiteliais intestinais, acompanhado por destruição da mucosa e estabelecimento de um severo processo inflamatório (DUCAN; GRANT, 2003; SONIS 2004; APRILE *et al.*, 2015).

No presente estudo observou-se que o comprimento dos vilos, a profundidade das criptas e a relação vilo/cripta apresentaram alterações deletérias como as descritas na literatura (SONIS *et al.*, 2004, PEREIRA *et al.*, 2016) devido a utilização do 5-FU e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU foi capaz de reverter essas alterações. Diversos mecanismos podem ser evocados para a recuperação da integridade da barreira morfofuncional, dentre estes podemos citar a migração dos enterócitos para reparar o epitélio danificado e auxiliar no processo de resolução do processo inflamatório (CHANG *et al*, 2017).

Esse potencial efeito benéfico da utilização de esporos de *B. clausii* pode ser explicado possivelmente por sua capacidade de tratar ou prevenir alterações que levem a deficiência da barreira intestinal por exercer efeitos antimicrobianos e atividades imunomoduladoras (URDACI *et al*, 2004, DI CARO *et al*, 2005), regulação do crescimento celular e diferenciação, sinalização de célula à célula, adesão celular, transcrição de sinal e transdução (DI CARO *et al*, 2005), produção de vitaminas (SALVETTI *et al*, 2003) e proteção contra agentes genotóxicos intestinais (CENCI *et al.*, 2006).

Evidencia-se na literatura que a destruição das células epiteliais após a indução da mucosite intestinal é o principal estímulo para o recrutamento de células

inflamatórias para a mucosa intestinais estando as ulcerações associadas com a ativação dos fatores nucleares de transcrição da família NF- κ B (SONIS, 2004; 2009; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004). A migração de neutrófilos para as células epiteliais pode induzir alterações de permeabilidade do epitélio intestinal. Essas alterações da permeabilidade poderiam estar relacionadas a eventos dispépticos associados à mucosite intestinal por 5-FU (EDENS *et al.*, 2002).

Um dos mecanismos para o dano intestinal evidenciados durante a mucosite intestinal ocorre inicialmente após a liberação de EROs, e por consequência a desestabilização das estruturas orgânicas, levando a destruição do DNA das células epiteliais intestinais e morte celular, além de um poderoso estresse oxidativo (SONIS, 2004; MAEDA *et al* 2010). Por isso, torna-se crucial a quantificação da concentração da glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídeo (L- γ -glutamyl-cysteinyl-glicina) que atua principalmente como um antioxidante endógeno, tendo papel crucial no combate a radicais livres, defendendo as células do estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2012). Seu consumo reflete uma defesa celular contra a liberação de EROs, que por sua vez estão presentes na fisiopatologia da mucosite (MAEDA *et al* 2010; PEREIRA *et al.*, 2016).

Com o objetivo de investigar se o tratamento com *B. clausii* poderia trazer benefícios também nesse parâmetro de estudo, a análise dos dados, evidenciou que os níveis de GSH estavam diminuídos nos animais tratados com 5-FU, demonstrando que esses achados estavam de acordo com o que foi demonstrado por outros autores (JUSTINO *et al.* 2014; 2015), e com isso observou-se que o tratamento com 5-FU traz a consequente ação de ROS induzindo a um intenso estresse oxidativo no intestino. Observou-se que os animais tratados com *B. clausii* + 5-FU apresentaram níveis de GSH mais elevados. Esse fato revela que *B. clausii* pode ser uma ferramenta eficaz no combate a mucosite intestinal embora o mecanismo correto como ele exerça esses efeitos ainda não foi estabelecido.

Podemos sugerir que a ação protetora de *B. clausii* seja por sua capacidade de alterar vias e genes relacionados ao processo inflamatório e assim trazer benefícios ao hospedeiro. A literatura já demonstra que essa hipótese é plausível devido ao fato de que os genes ligados à resposta inflamatória, imune e de defesa, permeabilidade intestinal, adesão celular, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, apoptose, transcrição de sinal e transdução foram modulados pelo tratamento com *B. clausii* em humanos (DI CARO *et al.*, 2005). Entre estes genes, *B.*

clausii pode desencadear a expressão de defensinas, que são cruciais na defesa da barreira intestinal contra possíveis agentes patogênicos, contribuindo de forma benéfica durante a disbiose (O'NEIL, 2003).

Na mesma perspectiva de avaliar o processo de estresse oxidativo, agora a luz da presença de peroxidação lipídica medida através da dosagem do malonildialdeído (MDA), uma vez que esse representa o principal aldeído reativo formado na peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas biológicas, sendo lido como marcador de dano celular via estresse oxidativo (VACA *et al.*, 1988) foram dosados os níveis de MDA em animais tratados com 5-FU e *B. clausii*.

Os resultados obtidos desta análise demonstram que os níveis de MDA estavam aumentados nos animais tratados com 5-FU e juntamente com o que foi demonstrado para os níveis de GSH encontrados sugere-se que 5-FU atue como pró-oxidante sobre o epitélio intestinal, mantendo a mucosa em constante dano oxidativo. Hipotetizamos que, nesse contexto de dano oxidativo, *B. clausii* possa atuar, prevenindo a mucosite induzida por 5-FU, pois o tratamento *B. clausii* + 5-FU diminuiu os valores de MDA quando comparados aos animais tratados somente com 5-FU.

Não está estabelecido o mecanismo de ação probiótica do *B. clausii*, mas, foi demonstrado que este pode atuar induzindo vias anti-inflamatórias e diminuindo a expressão de vias pró-inflamatórias (DI CARO *et al.*, 2005) podemos hipotetizar que a presença desse microrganismo atue como um protetor da mucosa durante esse tratamento pois, a literatura demonstra que este é capaz de sobreviver durante o seu trânsito GI e manter quantidade considerável no intestino por até 12 dias após uma única administração oral tendo capacidade de germinar 6 horas após a administração (GHELARDI *et al.*, 2015).

Após a avaliação dos eventos inflamatórios presentes na mucosite intestinal induzida por 5-FU passou-se a analisar se o probiótico *B. clausii* teria algum efeito protetor nas alterações funcionais da motilidade gastrointestinal, tal como foi descrita por Soares *et al.* (2008) onde esses autores demonstraram pela primeira vez que a administração de 5-FU causou a inflamação de todo o intestino delgado em ratos, resultando também em alteração da contratilidade no fundo gástrico e do músculo liso duodenal que, avaliado na presença de carbacol, apresentou hipercontratilidade na fase inflamatória e pós-inflamatória, contrastando com o retarde do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal observado também por esses autores (SOARES *et al.*, 2008).

Avaliou-se ainda, se o tratamento com *B. clausii* teria algum efeito sobre o retarde do esvaziamento gástrico e o trânsito gastrintestinal bem como as alterações contráteis do músculo liso jejunal e ileal em animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Ainda com vistas a esclarecer o papel protetor desse probiótico sobre as alterações da mucosa intestinal avaliou-se o transporte intestinal de água e eletrólitos, a permeabilidade intestinal e a TEER.

A análise dos dados demonstrou retarde no esvaziamento gástrico e no trânsito intestinal em animais com mucosite, resultados que vão ao encontro do descrito na literatura, pois Justino *et al.* (2015; 2014) também observaram essas alterações por 5-FU em camundongos, e, principalmente, por Soares *et al.* (2008), quando descrevem pela primeira vez a associação entre a mucosite e o dano funcional do TGI traduzido por uma situação contraditória de retardo do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal e hipercontratilidade do músculo liso intestinal 3 e 15 dias após a indução de mucosite através da administração de 5-FU por dose única.

A literatura está de acordo com o que foi descrito por esses autores e que também foram encontrados no presente estudo. Foi evidenciado, no presente estudo, retarde do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal e hipercontratilidade do músculo liso e esse efeito reflete o que acontece na prática clínica, quando pacientes submetidos à terapia anticâncer manifestam desordens da motilidade gastrintestinal (NELSON *et al.*, 2002, RIEZZO *et al.*, 2005) com repercussão em sintomas tais como, dispepsia, disfagia e diarreia, onde esse conjunto de sintomas foi denominado síndrome dispéptica associada à quimioterapia do câncer (CADS) (RIEZZO *et al.*, 2005).

Embora não tenhamos avaliados as alterações da mucosite intestinal por 5-FU e o tratamento *B. clausii* + 5-FU no 15º dia, nossos resultados mostram que o tratamento com *B. clausii* + 5-FU preveniu os eventos de retenção gástrica e diminuição do trânsito gastrintestinal e também foi capaz de reverter a hipercontratilidade jejunal e ileal quando comparados aos animais tratados com 5-FU de forma individual.

Esse fato pode ser parcialmente explicado, como mencionamos anteriormente, pela capacidade desse probiótico ser indicado em casos de diarreia e também como foi demonstrado no presente estudo ter melhorado o peso dos animais com mucosite e como este probiótico pode também atuar em vias imunomoduladoras do processo inflamatório tais como descrito por Urdaci *et al.* (2004) sustentamos a

hipótese de que tratamento com *B. clausii* após reduzir o processo inflamatório melhora a função gastrointestinal durante a mucosite intestinal induzida por 5-FU.

Soares *et al.* (2008) atribuíram o retarde do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal às alterações na motilidade intestinal impostas pelo processo inflamatório intestinal, uma vez que o maior tempo do movimento de massa gastrointestinal em animais com mucosite ocorre na ausência de danos inflamatórios do estômago, mas com desordens inflamatórias intestinais (MOREELS *et al.*, 2001; AKIHO *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2008).

Soares *et al.* (2008) sustenta ainda, que, o efeito do 5-FU sobre o retarde do esvaziamento gástrico em ratos, pode ser oriundo do aumento na complacência gástrica ou na resistência antro-duodenal (HABA; SARNA, 1993, SOARES., *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que a hipomotilidade intestinal e o retarde do esvaziamento gástrico podem ser encontrados em um modelo de íleo paralítico em rato (DE JONGE *et al.*, 2003). Observou-se ainda, que a sepse inibe a motilidade gastrointestinal podendo ser influenciada pela produção de óxido nítrico (DE WINTER *et al.*, 2010).

Outro resultado obtido que está de acordo com a literatura, e foi observado de maneira isolada na fase inflamatória da mucosite, é aceleração do trânsito intestinal, fato esse que pode ser o responsável pela diarreia persistente que acomete os camundongos 3 dias após a administração de 5-FU, também observada em ratos (SOARES *et al.*, 2008) e coincide com a observação clínica em humanos que fazem uso de 5-FU.

Diante do que foi exposto vale salientar que a literatura carece de informações sobre a atuação de probióticos na motilidade intestinal. No entanto, dados da literatura demonstraram que a inflamação intestinal está associada com anormalidades do controle da motilidade gastrointestinal em modelos de lesão inflamatória (MARTINOLLE *et al.*, 1995; AKIHO *et al.*, 2005) e é evidente que o processo inflamatório traz consigo a ativação de células capazes de produzir substâncias que podem levar a uma dismotilidade gastrointestinal tais como os macrófagos que podem produzir óxido nítrico e prostaglandinas contribuindo então para a dismotilidade (TAJIMA *et al.*, 2012).

Verdú *et al.* (2004) demonstraram que os probióticos diminuem a hipercontratilidade do músculo modelo murino de disfunção intestinal pós-infecciosa.

Este provavelmente ocorre tanto via modulação imunológica da resposta à infecção como por um efeito do probiótico ou através de um metabólito, ainda não identificado, produzido pelo probiótico durante a hipercontratilidade muscular pós-infecciosa.

Urdaci *et al.* (2004) demonstraram cepas de *B. clausii* foram capazes de induzir a atividade da NOS II sintetase, a produção de IFN- γ e a proliferação de células T CD4⁺, desta forma podemos hipotetizar que a modulação de vias anti-inflamatórias podem repercutir na melhora da dismotilidade e na contratilidade observadas nesse estudo, pois nesse contexto inflamatório e repercussão de alterações funcionais *B. clausii* foi capaz de prevenir tanto o retarde do esvaziamento gastrointestinal quanto trânsito intestinal e melhorar a hipercontratilidade do músculo liso intestinal.

Os resultados de transporte intestinal de água eletrólitos, do presente estudo, estão de acordo com o descrito na literatura onde os animais tratados com 5-FU apresentaram aumento da secreção de H₂O, Na⁺, K⁺ e Cl⁻ e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU foi capaz de reverter esses efeitos voltando a uma situação de absorção desses íons (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004)

O epitélio intestinal tem a finalidade de transportar nutrientes essenciais para o organismo, além de ser uma barreira seletiva que reveste e protege o intestino, evitando a absorção de substâncias nocivas. No entanto, a parede intestinal pode sofrer modificações em decorrência de doenças como cirrose hepática, pancreatite aguda, doença celíaca, câncer de cólon, doença de Crohn, mucosite intestinal e reações adversas a alimentos, podendo apresentar manifestações clínicas como diarreia e perda de peso, devido alteração na permeabilidade intestinal (BARBOZA *et al.*, 1999).

A barreira intestinal é um complexo sistema responsável pela saúde do hospedeiro composta por lâmina própria e matriz, sistema imunológico, vias vasculares e linfáticas e sistemas neuroentéricos e enteroendócrinos. Muitas doenças estão associadas quebra da barreira funcional intestinal e nesse cenário, um probiótico perfeito deve ser capaz de restaurar biodiversidade dentro da microbiota, antagonizar microrganismos patogênicos, melhorar a produção de muco em termos de abundância e composição, estimular a proliferação epitelial para reestabelecer a composição da mucosa, modular a permeabilidade intestinal e melhorar tanto os aspectos anti-inflamatórios quanto anti-fibróticos (SCALDAFERRI *et al.*, 2013).

Funcionalmente, a perda de integridade da barreira epitelial intestinal ocasiona uma maior permeabilidade do conteúdo luminal. No presente estudo, utilizou-se uma câmara de difusão para medições de permeabilidade à fluoresceína, uma molécula de tamanho pequeno e também para medição da TEER.

Os resultados dessas análises mostraram uma maior permeabilidade à fluoresceína nos animais tratados com 5-FU em comparação aos animais controle e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU preveniu esse aumento da permeabilidade. É sabido que o 5-FU pode comprometer a barreira epitelial funcional por causar diminuição dos vilos e aumento da profundidade das criptas e destruir a área absorptiva dos enterócitos (DUCAN; GRANT, 2003; SONIS 2004; APRILE *et al* 2015). Embora não tenhamos avaliado a expressão de genes e vias relacionados ao processo inflamatório, não podemos descartar que *B. clausii* pode trazer benefícios à recuperação da barreira epitelial funcional atuando em eventos que possam melhorar a permeabilidade intestinal, adesão celular, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, apoptose, transcrição de sinal e transdução, pois em humanos essas vias foram moduladas pelo tratamento com *B. clausii* e estudos posteriores podem evidenciar as lacunas que existem em relação à ação protetora desse probiótico e a expressão desses genes em doenças que comprometem o TGI (DI CARO *et al.*, 2005).

Dentre os resultados avaliados a TEER, no presente estudo, mostrou-se diferente do que a literatura tem descrito onde a TEER é diminuída com o 5-FU e no presente estudo houve aumento desse parâmetro estudado e o tratamento com *B. clausii* + 5-FU manteve os valores de TEER semelhantes ao tratamento com 5-FU de forma isolada (PRISCIANDARO *et al.*, 2012). É possível que o tratamento com *B. clausii* + 5-FU reflita mecanismos de proteção sobre a permeabilidade intestinal com melhoria da integridade e recuperação da mucosa, melhorando assim a TEER.

O aumento de TEER nos animais tratados com 5-FU necessita de mais estudos para melhor compreensão dessa diferença em relação ao que já havia sido evidenciado na literatura. Semelhantemente ao que foi encontrado no presente estudo, Nakao *et al.*, utilizando tratamento com irinotecano, também encontraram esse valor de TEER aumentado contraditando ao que a literatura preconiza. A hipótese sugerida por este autor é que o edema limita o movimento passivo de ions em todo o tecido e eleva TEER. Outros estudos devem ser realizados para melhor compreensão desse fenômeno uma vez que no presente estudo houve aumento da

secreção de água e eletrólitos e isto pode ter influência sobre os movimentos de transporte de íons no intestino.

A aplicação de preparações que contenham *B. clausii* no tratamento ou prevenção do comprometimento da fisiologia intestinal é amplamente apoiada nos últimos anos e tem sustentado suas aplicações clínicas. Seus efeitos favoráveis foram associados a várias propriedades, que são cruciais para manter a homeostase intestinal. No entanto, seu mecanismo de ação ainda não é compreendido e novos estudos são necessários para melhorar suas propriedades terapêuticas. Futuros ensaios clínicos bem desenvolvidos devem ser realizados na tentativa de elucidar os mecanismos de ação desse probiótico tais como um estudo de microbioma que comprove sua atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas durante o curso da mucosite, estudo mais aprofundado sobre as vias das interleucinas anti-inflamatórias e as linhagens da imunidade que podem ser favorecidas por esse probiótico. Estudos sobre substâncias produzidas por este bacilo tais como a clausina (aprofundando suas repercussões biológicas) e não deve ser desconsiderados também, estudos sobre a atividade probiótica não apenas dessas cepas, mas também dos sobrenadantes produzidos durante sua cultura.

Nesse sentido pode-se observar que o probiótico *B. clausii* apresenta efeitos benéficos que podem ser considerados promissores na busca de alternativas que venham a melhorar ou atenuar o tratamento das reações adversas produzidas pelo 5-FU em pacientes que utilizam este fármaco no tratamento quimioterápico.

Diante dos dados que obtivemos sugerimos o modelo hipotético que pode ser observado na figura 23 abaixo:

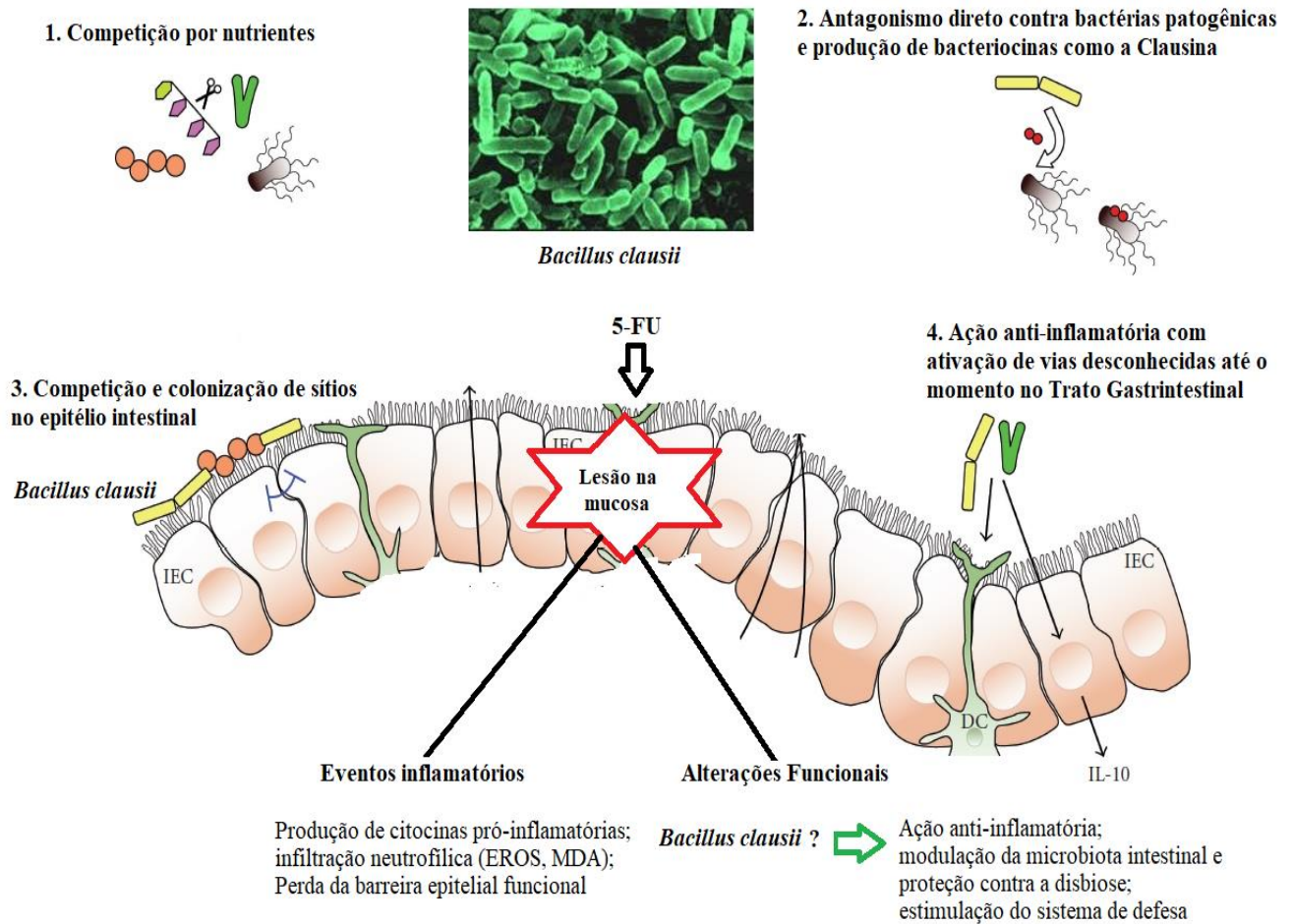


Figura 23 – Modelo hipotético dos possíveis mecanismos de ação do probiótico *Bacillus clausii* na proteção contra a mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos

9. CONCLUSÃO

- ✓ *B. clausii* atenuou as alterações de perda de peso, infiltração de neutrófilos e alterações histopatológicas causadas no modelo de lesão intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.
- ✓ *B. clausii* atenua a inflamação protegendo contra os efeitos da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.
- ✓ *B. clausii* pode recuperar a motilidade gastrointestinal alterada no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.
- ✓ *B. clausii* pode agir como protetor da barreira epitelial funcional alterada durante a mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHO, H.; BLENNERHASSETT, P.; DENG, Y.; COLLINS, S. M. Role of IL-4, IL-13 and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. ***Am. J. Physiol.*** 282,226-232, 2002.

AL SAFARJALANI, O. N. *et al.* Modulation of 5-fluorouracil host-toxicity and chemotherapeutic efficacy against human colon tumors by 5-(Phenylthio) acyclouridine, a uridine phosphorylase inhibitor. ***Cancer Chemother Pharmacol.***, v. 58, p. 692–698, 2006.

ALVARENGA, A.; LOTTENBERG, A.M.P.; SALGADO, J.M.; BORGES, V.C. Impacto dos alimentos funcionais para a saúde. ***Rev Nutrição.*** 305:1181–1188, 2001.

ALVERDY, J. C. Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. ***JPEN.*** 14 (4 Suppl):109S-113S, 1990.

ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. ***Arch Biochem Biophys,*** Ireland, 500(1): 92-106, 2010.

ARUMUGAM M, RAES J, PELLETIER E, LE PASLIER D, YAMADA T, MENDE DR, *et al*. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**.473:174-80, 2011.

BARBOZA Jr., M.S.; SILVA, T. M. J.; GUERRANT, R. I.; LIMA, A. A. M. Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. **Braz J Med Biol**.32:1499-1504. 1999.

BOKEMEYER, C.; HARTMANN, J. T. Oral and gastrointestinal toxicity. In: LIPP, H.-P. Anticancer drug toxicity: prevention, management and clinical pharmacokinetics. **New York: Marcel Dekker**. 4:235-61, 1999.

BOSSI, P.; LUCCHESI, M.; ANTONUZZO, A. Gastrointestinal toxicities from targeted therapies: measurement, duration and impact. **Curr Opin Support Palliat Care**.9: 163-167, 2015.

BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; *et al*. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. **Cancer Biology Therapy**. 6:1449-54, 2007.

BOWEN, J.M., GIBSON, R. J., CUMMINS, A. G., KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support Care Cancer**. 14(7): 713-731, 2006.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**. 33 (6):1359–1369, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do Câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2018.

CALABRESI P, CHABNER BA. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: HARDMAN JG, LIMBIRD LE, MOLINONOFF PB. Goodman & Gilman: as bases 73 farmacológicas da terapêutica. 10ª Edição. Rio de Janeiro: **McGraw-Hill Interamericana**. 2012.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, L. P. F.; ARAÚJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G. H. P.; BRITO, G. A. C.; LIMA, V.; MONTEIRO, S. M. N.; SANTOS, F. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digest. Dis. Sci.** 49(1):65-72, 2004.

CENCI G, TROTTA F, CALDINI G. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *B.clausii*. **J Appl Microbiol.**;101(6):1208–1215, 2006.

CHANG, X., ZHAO, L., WANG, J., LU, X., and ZHANG, S. Sini-san improves duodenal tight junction integrity in a rat model of functional dyspepsia. **BMC Complement Altern. Med.** 17:432, 2017.

CHU E. Drug development. In: DEVITA Jr VT, HELLMAN S, ROSENBERG SA. Cancer: principles and practice of oncology, pancreatic cancer. 7. ed. **Philadelphia**. Lippincott Williams e Wilkins. 2005.

CIPRANDI G, VIZZACCARO A, CIRILLO I, *et al.* B. clausii effects in children with allergic rhinitis. **Allergy**.;60(5):702–703, 2005.

CIPRANDI, G., TOSCA, M.A., MILANESE, M., CALIGO, G. AND RICCA, V. Cytokines evaluation in nasal lavage of allergic children after *B. clausii* administration: a pilot study. **Pediatr Allergy Immunol.** 15: 148–151, 2004.

COOL, J. C. *et al.* Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Growth Horm IGF-56.**15:72–82, 2004.

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

DANTAS, R. F. Atividade de glutathione peroxidase e relação de glutathione reduzida/glutathione oxidada como biomarcadores de estresse oxidante em mudilídeos. Dissertação (**Mestrado Acadêmico em Ciências**) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

De WINTER, B. Y.; De MAN, J. G. Interplay between inflammation, immune system and neuronal pathways: Effect on gastrointestinal motility. ***World J Gastroenterol.***16(44):5523-5535. 2010.

DI CARO S, TAO H, GRILLO A, *et al.* B. clausii effect on gene expression pattern in small bowel mucosa using DNA microarray analysis. ***Eur J Gastroenterol Hepatol.*** 17(9):951–960, 2005.

DUC, L.H., HONG, H.A. AND CUTTING, S.M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen presentation. ***Vaccine.*** 21:4215–4224, 2003.

DUC, L.H., HONG, H.A., BARBOSA, T.M., HENRIQUES, A.O. and CUTTING, S.M. Characterization of Bacillus probiotics available for human use. ***Appl Environ Microbiol.***70:2161–2171,2004.

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

EDENS, H. A.; LEVI, B. P.; JAYE, D. L.; WALSH, S.; REAVES, T. A.; TURNER, J. R.; NUSRAT, A.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: Evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. ***J. Immunol.***169:476–486, 2002.

FARMER S. G, LANIYONU A. A. Effects of *p*-chlorophenylalanine on the sensitivity of rat intestine to agonists and on intestinal 5-hydroxytryptamine levels during *Nippostrongylus brasiliensis* infection. **Br J Pharmacol.** 82:883–889, 1984.

FERLAY J, SHIN H, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer: GLOBOCAN 2011. **Int J Cancer.** 127:2893-917. 2011.

FERNANDES, C. WANDERLEY, C W S. SILVA, C M SOUZA *et al* 2018: Role of regulatory T cells in irinotecan-induced intestinal mucositis, **Eur Journal of Pharmaceutical Sciences.** in press, 928-987, 2018.

FERRARIS, R. P.; VINNAKOTA, R. R. The time course of adaptation of intestinal nutrient uptake in mice is independent of age. **J. Nutr.**, v.125, n.8, p.2172-2182, 1995.

FERREIRA, T. M.; LEONEL, A. J.; MELO, M. A.; SANTOS, R. R. G.; CARA, D. C.; CARDOSO, V. N.; CORREIA, M. I. T. D. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-Fluorouracil administration. **Lipids.** 47:669–678, 2012.

FOX, A. D.; KRIPKE, S. A.; DE PAULA, J.; BERMAN, J. M.; SETTLE, R. G.; ROMBEAU, J.L.. Effect of a glutamine-supplemented enteral diet on methotrexate-induced enterocolitis. **JPEN.** 12 (4): 325-331, 1988.

FULLER R. Probiotics in human medicine. **Gut** 32, 439–442, 1991.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 365–378, 1989.

GAO, J. *et al.* Activation of p38-MAPK by CXCL4/CXCR3 axis contributes to p53-dependent intestinal apoptosis initiated by 5-fluorouracil. **Cancer Biology & therapy.** 15(8):982-991, 2014.

GENOVESE, T. Hypericum perforatum attenuates the development of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Shock,** Ireland, v. 25, n. 2, p. 161-167, 2006.

GHELARDI E, CELANDRONI F, SALVETTI S, *et al.* Survival and persistence of *B. clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation. ***J Appl Microbiol.***;119(2):552–559, 2015.

GIBSON RJ, BOWEN JM, INGLIS MR, CUMMINS AG, KEEFE DM. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. ***J Gastroenterol Hepatol.*** 18(9):1095-100, 2003.

GIBSON, R. J; BOWEN, J. M.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. ***Clin. Exp. Med.*** 4:188-95, 2005.

GIBSON RJ, KEEFE DM. Cancer chemotherapy-induced diarrhea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. ***Support Care Cancer.*** 14:890–900, 2006.

GIBSON RJ, KEEFE DM, LALLA RV, BATEMAN E, BLIJLEVENS N, FIJLSTRA M, *et al.*. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. ***Supp Care Cancer*** 21(1):313–26, 2013.

GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. ***International Agency for Research on Cancer (IARC)***. Disponível em http://globocan.iarc.fr/old/bar_sex_pop.asp?selection=900&title=World&statistic=1&number=20&window=1&grid=1&color1=5&color1e=&color2=4&color2e=&submit=%C2%A0Execute Acesso em : 19 janeiro de 2018.

GOLDHILL J. M., STOJADINOVIC, A., KIANG J, SMALLRIDGE, R., SHEA-DONOHUE T. Hyperthermia prevents functional, histological and biochemical abnormalities induced during ileitis. ***Neurogastroenterol Motil.*** 11:69–76, 1999.

GUERRANT RL. Alanine-glutamine hastens morphologic recovery from 5-Fluorouracil-induced mucositis in mice. ***Nutrition*** 20: 934 – 941; 2004.

HABA, T.; SARNA, S. K. Regulation of gastroduodenal emptying of solids by gastropyloroduodenal contractions. ***Am J Physiol***. 264:261-271,1993.

HAUER-JENSEN F., HENSLEY, K.; ROBINSON, K. A.; GABBITA, S. P.; SALSMAN, S.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. ***Free Radical Biology & Medicine***. 28:(10)1456–1462, 2004.

HEIDELBERGER, C. *et al.* Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. ***Nature***.179: 663–666, 1957.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.;SCHILLINGER, U.; HUISINTVELD, J. H. Overview of gut flora and probiotics. Intern. ***Jour of Food Microb***.41(2):85-101,2002.

HUANG, T. Y. *et al.* Minocycline attenuates 5-fluorouracil-induced small intestinal mucositis in mouse model. ***Biochem Biophys Res Commun***. 389: 634–639, 2009.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) Ministério da Saúde. Estimativa 2018-2019: ***Incidência de câncer no Brasil***. Rio de Janeiro:Inca, 2018. <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp> > Acesso em: 12 fevereiro de 2018.

JOHANSSON, M.; LARSSON, J.; HANSSON, G. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of hostmicrobial interactions. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***.108: 4659-4665, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. ***Histologia Básica***. 9ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1999. 524p.

JUSTINO, P. F. C *et al.*, Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. ***British Journal of Nutrition***, 111(9), 1611-1621, 2014.

JUSTINO, P. F. C *et al.*, Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. ***Cancer Chemother Pharmacol.*** 75:559–567. 2015.

KAGNOFF, M. F.; ECKMANN, L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. ***The Journal of Clinical Investigation.***100 (1): 259–263, 1997.

KATZUNG, B. G., MASTERS, S. B., TREVOR, A. J. Farmacologia Básica e Clínica. 12^a ed. ***Lange. Artmed.*** Porto Alegre. 8: 789 -1000, 2014.

KAWASHIMA, R., KAWAKAMI, F., MAEKAWA, T. et al. ***Cancer Chemother Pharmacol,*** 76: 269-277, 2015 .

KEEFE, D. M. K.; GIBSON, R. J; HAUER-JENSEN, M. Gastrointestinal mucositis. ***Seminars in Oncology Nursing.*** 20(1):.38-47, 2004.

KEEFE, D. M. K, Intestinal mucositis: mechanisms and management.***Current Opinions in Oncology.*** 19:.323-327, 2007.

KEEFE, D. M. K. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? ***Cancer Chemother Pharmacol.***.63:239–251, 2009.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. ***J Leukoc Biol,*** Ireland, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

KUMAR, C.G., JOO, H.S., KOO, Y.M., PAIK, S.R. and CHANG, C.S. Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic *B. clausii* isolate. ***World J Microbiol Biotechnol .***20, 351–357, 2004.

LALLA, R. V.; SHUBERT, M. M.; BENSADOUN, R. J.; KEEFE, D. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. ***Support Care Cancer,*** 14:.558–565, 2006.

LALLA, R.V; BOWEN, J; BARASCH, A; ELTING, L; EPSTEIN, J; KEEFE, D.M; McGUIRE, D.B; MIGLIORATI, C; NICOLATOU-GALITIS, O; PETERSON, D.E; RABER-DURLACHER, J.E; SONIS, S.T; ELAD, S. MASCC/ISOO Clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**. 1453-1461. 2014.

LEE SH, SON MH, SUNG KW, CHOI YB, LEE NH, YOO KH, KOO HH, DO LIM H, SHIN HJ. Toxicity of tandem high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation using carboplatin–thiotepa–etoposide and cyclophosphamide–melphalan regimens for malignant brain tumors in children and Young adults. **J Neurooncol**. 120(3):507–513, 2014.

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**. 59(5):603-612, 2007.

LEOCÁDIO, P. C L.; ANTUNES, M. M.; TEIXEIRA, L. G. LEONEL, A. J.; LEITE, J. I. A.; MACHADO, D. C. C.; GENEROSO, S. V. CARDOSO, V. N.; CORREIA, M I T. D. L-Arginine Pretreatment Reduces Intestinal Mucositis as Induced by 5-FU in Mice. **Nutrition and Cancer**.67 (3): 486-493 2015;

LEVITZKI, A. , KLEIN, S. Signal transduction therapy of cancer. **Mol Aspects Med**. 31 (4): 287-329, 2010

LIMA-JÚNIOR, R.C.P, FREITAS, H.C, WONG D.V.T, et al. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**. 171(9):2335-2350, 2014.

LINHARES, S.; GEWANDDSZNAJDER, F. **Biologia Hoje**. 14^a ed. Ática. São Paulo, 2005. 696p.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature reviews. Cancer**. 3(5): 330–338, 2003.

LOPETUSO, L.R; SCALDAFERRI, F; FRANCESCHI, F and GASBARRINI, A :*Bacillus clausii* and gut homeostasis: state of the art and future perspectives. **Expert Rev of Gastroenterol & Hepatol.** 10: 943-948, 2016.

LU, H. *et al.* The chemokine CXCL9 exacerbates chemotherapy-induced acute intestinal damage through inhibition of mucosal restitution. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 141 983-992, 2015.

LU, J. *et al.* Polyunsaturated fatty acids block platelet-activating factor-induced phosphatidylinositol 3 kinase/Akt-mediated apoptosis in intestinal epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 294:1181–1190, 2008.

MADARA, J. L.; PATAPOFF, T. W.; GILLECE-CASTRO, B.; COLGAN, S. P.; PARKOS, C. A.; DELP, C.; MRSNY, R. J. 5'-AMP is the neutrophil derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 epithelial monolayers. **The Journal of Clinical Investigation.** 91:2320–2325, 1993.

MAEDA T, MIYAZONO Y, ITO K, HAMADA K, SEKINE S, HORIE T, Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats, **Cancer Chemother Pharmacol** 65:1117–1123, 2010.

MAZZA, P., ZANI, F. AND MARTELLI, P. Studies on the antibiotic resistance of *Bacillus subtilis* strains used in oral bacteriotherapy. **Boll Chim Farmaceutic** 131, 401–408, 1992.

MAZZA, P. The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism. **Boll Chim Farmaceutic** 133, 3–18, 1994.

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

MEDEIROS CA, *et al.* Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol.** 67 (5): 1085-1100, 2010.

MELO, M.L. *et al.*, Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.** 61 (5): 775-784 2007.

MI H, DONG Y, ZHANG B, WANG H, PETER C, C, K, GAO P, FU H, GAO Y, Bifidobacterium Infantis Ameliorates Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis Via Regulating T Cell Immunity in Colorectal Cancer Rats. **Cell Physiol Biochem** 42:2330-2341, 2017.

MISODOR. Disponível em: <<http://www.misodor.com/images/5h66j78k.jpg>>. Acesso em: 12 fevereiro. 2018

MOREELS T G; DE MAN J G; DE WINTER B. Y; HERMAN A.G; PELCKMANS P. A. How to express pharmacological contractions of the inflamed rat intestine. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 364 :524–533, 2001.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology.** 14:667-685, 2014.

MUKHERJEE, S. O imperador de todos os males: uma biografia do câncer. 1^o ed, São Paulo, **Companhia das Letras**, 2012.

NAKAO, T; KURITA, N; KOMATSU, M; YOSHIKAWA, K; IWATA, T; UTUSNOMIYA, T; SHIMADA, M. Irinotecan injures tight junction and causes bacterial translocation in rat. **J Surg Res.** 173(2):341-347. 2012.

NELSON, K.; WALSH, D.; SHEEHAN, F. Cancer and chemotherapy-related upper gastrointestinal symptoms: the role of abnormal gastric motor function and its evaluation in cancer patients. **Support. Care. Cancer.**, v. 10: p. 455 – 461, 2002;

NIELSEN, P., FRITZE, D. and PRIEST, F.G. Phenetic diversity of alkaliphilic Bacillus strains: proposal for nine new species. **Microbiology.** 141: 1745–1761, 1995.

NISTA EC, CANDELLI M, CREMONINI F, CAZZATO IA, ZOCCO MA, FRANCESCHI F, CAMMAROTA G, GASBARRINI G, GASBARRINI A. B. clausii therapy to reduce side-effects of anti-Helicobacter pylori treatment: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 20:1181–1188, 2004.

NUSRAT, A.; PARKOS, C. A.; LIANG, T. W.; CARNES, D. K.; MADARA, J. L. Neutrophil migration across model intestinal epithelia: monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair. *Gastroenterology.* 113:1489–1500, 1997.

O'NEIL DA. Regulation of expression of beta-defensins: endogenous enteric peptide antibiotics. *Mol Immunol*; 40(7):445–450, 2003.

OHANSSON, M.E. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 105, p. 15064-15069, 2008.

PAIVA, G.D. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev.*, v. 101, p. 3–9, 2006.

PEREIRA, V.B.M., MELO, A.T., ASSIS JÚNIOR, E.M. et al. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 77 (2): 323-327, 2015.

PRISCIANDARO, LD, GEIER, MS, CHUA, AE *et al.*: Probiotic factors partially prevent changes to caspases 3 and 7 activation and transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced epithelial cell damage *Support Care Cancer* . 20: 3205-3210, 2012.

PRITCHARD, D. M.; POTTEN, C. S.; HICKMAN, J. A. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Res.* 58: (23): 5453-65, 1998.

QIN J, LI R, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF KS, MANICHANH C, *et al* . A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**.;464:59-65, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Quimioterapia do câncer. In. Farmacologia. 4ª Edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2008.

RATTHE, C. *et al*. Interleukin (IL)-4 induces leukocyte infiltration in vivo by an indirect mechanism. **Mediators Inflamm.**, v. 2009, 2009.

RENCK, D. *et al*. Human uridine phosphorylase-1 inhibitors: a new approach to ameliorate 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. **Invest. New Drugs**. 32: 1301-1307, 2014.

REYNELL, R. S.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **Journal of Physiology**. 131:452-462, 1956.

RIBEIRO, R. A.; WANDERLEY, C. W; WONG, D. V. *et al*. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. 78: 881-893, 2016.

RIEZZO, G.; CLEMENTE, C.; LEO, S.; RUSSO, F. The role of electrogastrography and gastrointestinal hormones in chemotherapy-related dyspeptic symptoms. **J Gastroenterol**. 40: 1107–1115, 2005.

RIEZZO, G.; NELSON, K.; WALSH, D.; SHEEHAN, F. Cancer and chemotherapy-related upper gastrointestinal symptoms: the role of abnormal gastric motor function and its evaluation in cancer patients. **Support Care Cancer**.10: 455–461, 2002.

RUBENSTEIN, EB, *et al*. Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**. 100 (9 Suppl): 2026-2046, 2004.

RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis. III. The utilization. **Cancer research**, v. 14, n. 2, p. 119–123, 1954.

SALVETTI S, CELANDRONI F, GHELARDI E, *et al.* Rapid determination of vitamin B2 secretion by bacteria growing on solid media. **J Appl Microbiol.**95(6):1255–1260, 2003.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr Rev.** 61(3): 91-99, 2003.

SAVVA-BORDALO, J.; RAMALHO-CARVALHO, J.; PINHEIRO, M.; COSTA, V. L.; RODRIGUES, A.; DIAS, P. C.; VEIGA, I.; MACHADO, M.; TEIXEIRA, M. R.; HENRIQUE, H.; JERÓNIMO, C. Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. **BMC Cancer.**10: 420–427, 2010.

SCALDAFERRI F, GERARDI V, LOPETUSO LR, *et al.* Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. **Biomed Res Int.** 2013; 2013:435268.

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

SEIDLER, U.; LENZEN, H.; CINAR, A.; TESSEMA, T.; BLEICH, A.; RIEDERER, B. Molecular mechanisms of disturbed electrolyte transport in intestinal inflammation. **Annals of the New York Academy of Sciences.**1072: 262–275, 2006.

SOARES, P.M.G; MOTA , J.M.S.C ; BRITO, GA ; SOUZA, M. L. P. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil (5-FU)-induced inflammatory intestinal damage. In: Digestive Disease Week, 2006, Los Angelis. **Gastroenterology.**130:257-257, 2006.

SOARES, P.M.G. *et al.* Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol.** 63:91–98, 2008.

SOARES, P. M. G. *et al.* Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** 68:713–720, 2011.

SOARES, P. M. G. *et al.* Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquids in awake rats. **Arq. Gastroenterol.** [online]., vol.48, n.1 [cited 2018-01-18], pp.80-85, 2011.

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

SONIS, S. T. The biologic role of nuclear factor- κ B in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with antineoplastic therapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, p. 300–309, 2002.

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

SONIS, S. T *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer.** 100 (suppl. 9): 1995-2025, 2004.

SOUBA, W. W.; KLIMBERG, V. S.; HAUTAMAKI, R. D.; MENDENHALL, W. H.; BOVA, F. C.; HOWARD, R. J.; BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation. **J. Surg. Res.** 48 (1):1-5, 1990.

SOVERI, L. M. *et al.* Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: is efficacy an impact of toxicity? **European Journal of Cancer.** 50: 2966-2974, 2014.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, S. J. A.; HAMILTON, J.; KEEFE, D. M. K. Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. ***Experimental Biology and Medicine***. 234: 430-441, 2009.

STRINGER, A.M; GIBSON, R.J; LOGAN, R.M; BOWEN, J.M; YEOH, A.S.J; BURNS, J; KEEFE, D.M. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. ***Exp Biol Med***. 232(1): 96-106. 2007b.

TAJIMA T, MURATA T, ARITAKE K, URADE Y, MICHISHITA M, MATSUOKA T, NARUMIYA S, OZAKI H, HORI M. EP2 and EP4 receptors on muscularis resident macrophages mediate LPS-induced intestinal dysmotility via iNOS upregulation through cAMP/ERK signals. ***Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*** 302(5):524–534, 2012.

TOOLEY, K. L.; HOWARTH, G. S.; BUTLER, R. N. Mucositis and non-invasive markers of small intestinal function. ***Cancer Biology & Therapy***. 8(9): 753-758, 2009.

URDACI MC, BRESSOLLIER P, PINCHUK I. *Bacillus clausii* Probiotic Strains: Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. ***J Clin Gastroenterol*** 38: 86-90, 2004.

VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation product with DNA. A review. ***Mutat Research***. 195:(2):137-149, 1988.

VANHOECKE, B. *et al.* Dark agouti rat model of chemotherapy-induced mucositis: establishment and current state of the art. ***Experimental Biology and Medicine***. 240: 725-741, 2015.

VANUYTSEL T, VANORMELINGEN C, VANHEEL H, MASAOKA T, SALIM RASOEL S, TÓTH J, *et al.* (2014) From Intestinal Permeability to Dysmotility: The Biobreeding

Rat as a Model for Functional Gastrointestinal Disorders. PLoS ONE 9(10): e111132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111132>

VAN-VLIET, M. J. van; HARMSEN, H. J. M.; BONT, E. S. J. M. de; TISSING, W. J. E. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLOS Pathogens*. 6 (5):1000879, 2010.

VENKATESHA, R. T. *et al.* Platelet-activating factor induced chemokine gene expression requires NF-kappaB activation and Ca2p/calcineurin signaling pathways. Inhibition by receptor phosphorylation and betaarrestin recruitment. *J. Biol. Chem.* 279:44606–44612, 2004.

VERDE, S. M. M. L. Impacto do tratamento quimioterápico no estado nutricional e no comportamento alimentar de pacientes com neoplasia mamária e suas conseqüências na qualidade de vida. **Dissertação de mestrado**. São Paulo Faculdade de Saúde Pública da USP, 2007.

VERDÚ, ELENA F. *et al* *Lactobacillus paracasei* normalizes muscle hypercontractility in a murine model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology*, 127(3), 826–837, 2004.

WANG, HANRU *et al.* “*Escherichia Coli* Nissle 1917-derived factors reduce cell death and late apoptosis and increase transepithelial electrical resistance in a model of 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial cell damage.” *Cancer Biology & Therapy* 15:5560–569, 2014.

WHO World Health Organization. Guideline for the evaluation of probiotics in food. Canada 2002. **Disponível em www.who.int Acesso em 22/05/2017.**

WHO. World Health Organization. *American Cancer Society*. Global Cancer Facts & Figures. 3º Ed. Atlanta, 2015.

WLODARSKA, M. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. ***Infection and Immunity***. 79:1536-1545, 2011.

WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, C. B.; *et al.* The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. ***PLoS One***, DOI:10.1371/journal.pone.0139985, 2015.

WU, Z. Q *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, 2011a.

WU, Z. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-fluorouracil in a mouse mucositis model. ***Biomedicine & Pharmacotherapy***. 65: 339-344, 2011b.