



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**MARIELLE PIRES QUARESMA**

***Lactobacillus* spp. E *Bifidobacterium* sp. ATENUAM A MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA**

**2016**

MARIELLE PIRES QUARESMA

*Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* sp. ATENUAM MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza  
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- Q26l Quaresma, Marielle Pires.  
*Lactobacillus* spp. e *bifidobacterium* sp. atenuam a mucosite intestinal experimental induzida por 5-fluorouracil em camundongos / Marielle Pires Quaresma. – 2016.  
84 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Morfologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Mestrado em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2016.  
Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual.  
Orientação: Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza.  
Coorientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.
1. Mucosite. 2. Fluoruracila. 3. Probióticos. 4. Inflamação. I. Título.

MARIELLE PIRES QUARESMA

*Lactobacillus* spp. *EBifidobacterium* sp. ATENUAM A MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS

Projeto de dissertação apresentado ao Curso de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof.ª Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte

Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

Universidade Federal do Piauí – UFPI

*À Deus, que me abençoa sempre em sua infinita glória.*

*Aos meus pais, José Quaresma e Francisca Maria.*

*À minha grande amiga, Samara Rodrigues.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente, agradeço à Deus por permitir a conclusão deste trabalho.*

*Aos meus pais pelo apoio em toda minha vida acadêmica e por todo amor dedicado a mim.*

*Aos meus tios, tias, primos e primas pelo apoio e compreensão durante a realização deste trabalho.*

*Ao Professor Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, por ter acreditado em mim e me acolhido como aluna, agradeço por sua orientação e ensinamentos.*

*Ao Professor Emmanuel Prata por sua orientação e amizade.*

*À Prof. Dra. Antoniella Souza e Prof. Dra. Renata Leitão por fazerem parte da minha banca de qualificação, ajudando na melhoria do meu trabalho.*

*Ao Prof. Dr. André Luiz, Prof. Dr. Ricardo Lima e mais uma vez à Prof. Dra. Antoniella Souza por terem aceitado o convite para participarem da minha banca de Defesa de Dissertação.*

*Ao Professor Dr. Jand-venes e à equipe LAFFEX, por terem sido meus pilares no início da minha vida científica.*

*Ao Professor Dr. Ronaldo Ribeiro (in memorian) por toda sua contribuição para com nosso laboratório, e ter deixado como herança seu amor à pesquisa.*

*A todos os outros professores do departamento de Morfologia da UFC, que contribuíram de alguma forma para a minha formação no mestrado.*

*Aos meus amigos e colegas da pós-graduação do laboratório LEFFAG, Tiago, Marcos Aurélio, Cecília, Kaira, Deysen, Priscilla, Ronaldo, Talita, Fabrícia, Patricia, Álvaro, Athayde, Pedro Almir e aos demais, os quais se disponibilizaram a me ensinar e me ajudar nas realizações dos experimentos, e em todo decorrer do trabalho. Pelas horas de descontração, pelas conversas paralelas e por tornarem o trabalho mais divertido.*

*Ao amigo Renan Oliveira por toda ajuda e paciência na finalização deste trabalho.*

*Às minhas amigas, Samara Rodrigues, Karolina Santos e Herlice Veras por me acolherem em seu lar e me permitirem fazer parte da família PIAUÍ. Amo vocês!*

*Em especial à minha grande amiga Samara Rodrigues por seu meu braço direito desde minha ida para Fortaleza, me ajudando sempre na realização de trabalhos e experimentos como também na vida pessoal com seus conselhos e puxões de orelha.*

*À equipe do NEMPI, Flávia, Josi, Deiziane, Socorro, Dainesy e os demais, que estão sempre dispostos a ajudar.*

*À secretária da Pós-Graduação, Laísa, pela eficiência e gentileza.*

*Ao meu Pai, **José Quaresma**, por ter me dado uma boa criação, sempre fazendo o possível para me conceder uma boa educação, e por ser meu exemplo de trabalho, honestidade e perseverança. Te amo pai!*

*À minha mãe, **Francisca Maria**, por todo amor dedicado à mim, por toda preocupação que sempre teve para comigo, por ser meu refúgio de amor, além de me ensinar a ser uma pessoa humilde e honesta. Te amo mãe!*

*Ao meu irmão, **Maurilio Quaresma**, por me apoiar nos estudos e por ser meu exemplo de determinação e disciplina.*

*À minhas avós, **Maria de Nazaré** e **Yolanda Pires** que sempre me incentivaram, e ficavam felizes a cada vitória alcançada.*

*Aos meus avôs **José Luis** (in memorian) e **José Costa** (in memorian) pelos bons momentos convividos.*

*Aos meus amigos, **Alcione, Shirley, Flávia, Juliana, Ivani, Alynne, Carla Nazaré, Léia, Filho, Henrique, Romário, Bruno**, pelas boas gargalhadas e momentos de descontração.*

*À FUNCAP pelo suporte financeiro.*

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

*“A persistência realiza o impossível”.*

*(Provérbio Chinês)*



## RESUMO

A mucosite intestinal é um dos efeitos adversos mais incidentes do tratamento com 5-Fluorouracil. Nesse contexto, microrganismos probióticos são cada vez mais utilizados como alternativas para proteção da mucosa gastrointestinal deste efeito colateral e distúrbios associados. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de Probiotil<sup>®</sup> composto pelos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, e Probiatop<sup>®</sup> composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* na mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU. Para a execução do protocolo utilizou-se camundongos machos *Swiss* (25-30g) que foram tratados com dose única intraperitoneal de 5-FU (450mg/Kg i.p.), com exceção dos controles (Salina e DMSO). Os grupos probióticos foram tratados com o Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> 1h, 24h e 48h (v.o.) após a indução por 5-FU, sendo eutanasiados após 72h da indução de mucosite. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para as seguintes avaliações: mensuração da relação vilo/cripta; escores histológicos; dosagem de glutatona (GSH), malondialdeído (MDA), citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Além disso, avaliou-se a análise ponderal, leucograma, esvaziamento gástrico e trânsito intestinal dos animais. Observou-se que Probiatop<sup>®</sup> diminuiu a perda de peso induzida por 5-FU, mas este efeito não foi demonstrado pelo Probiotil<sup>®</sup>. Os probióticos não apresentaram efeito sobre a leucopenia induzida por 5-FU. Ambos os probióticos foram capazes de reverter alterações induzidas pelo tratamento com 5-FU nos três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo), como por exemplo, aumentaram os níveis de GSH (com exceção do íleo) e diminuíram de MDA, indicando uma redução de estresse oxidativo; diminuíram os níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, e o acúmulo de neutrófilos, amenizando a resposta inflamatória; reverteram o desarranjo da relação vilo/cripta demonstrando uma proteção da mucosa intestinal. Na análise histopatológica, os probióticos não apresentaram uma reversão significativa dos escores histológicos. O retardo do esvaziamento gástrico foi revertido pelo Probiatop<sup>®</sup>, mas não pelo Probiotil<sup>®</sup>. No entanto, não foi observado efeito dos probióticos sobre as alterações de trânsito intestinal. Diante do exposto, conclui-se que Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> protegem a mucosa intestinal a partir de atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto somente Probiatop<sup>®</sup> reverteu o esvaziamento gástrico.

**Palavras-chave:** Mucosite intestinal. 5-Fluorouracil. Probióticos. Processo inflamatório.

## SUMMARY

Intestinal Mucositis is a higher adverse effects of treatment with 5-fluorouracil. In this context, probiotics are widely used to protect gastrointestinal disorders. Here we report the effect Probiotil<sup>®</sup> composed by probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*, and Probiatop<sup>®</sup> composed by *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* in intestinal mucositis induced by 5-FU. Such methodology was used male Swiss mice (25-30g), treated with a single intraperitoneal dose by 5-FU (450 mg / kg ip), and controls with (saline and DMSO). In the Probiotics groups was administrated Probiotil<sup>®</sup> or Probiatop<sup>®</sup> 1h, 24h and 48h (V.O.) after induction by 5-FU . 72h after 5-FU administration, mice was euthanized. Segments from Duodenum, jejunum and ileum were removed for evaluations: measurement of villous / crypt ratio; Histological scores; concentration of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) activity and myeloperoxidase (MPO). In addition, we investigated the weight analysis, leukogram, gastric emptying and intestinal transit of animals. Our results showed that Probiatop<sup>®</sup> decreased the weight loss induced by 5-FU, but Probiotil<sup>®</sup> did not change weight loss. The probiotics had no effect on leukopenia but both probiotics were capable of reverting changes in three intestinal segments (duodenum, jejunum and ileum), such as increased GSH levels (except the ileum), decreased MDA levels, indicating a reduction oxidative stress. The probiotics decreased TNF- $\alpha$  and IL-6 levels, neutrophils infiltration, reducing the inflammatory response. The relationship villus / crypt was reversed, demonstrating intestinal mucosal protection. Probiotics did not show a significant reversal of histological scores. The delayed gastric emptying was reversed by Probiatop<sup>®</sup> but not by Probiotil<sup>®</sup>. However, there was no effect of probiotics on the intestinal transit changes. In conclusion, Probiotil<sup>®</sup> and Probiatop<sup>®</sup> protected the intestinal mucosa from antioxidant and anti-inflammatory activities. However, only Probiatop<sup>®</sup> reversed gastric emptying.

**Keywords:** Intestinal Mucositis. 5-Fluorouracil. Probiotics. inflammatory process.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Estruturas químicas do 5-FU, uracila e timina.....	21
<b>Figura 2.</b> Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.....	22
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil sobre a enzima timidilato sintetase.....	23
<b>Figura 4.</b> Fisiopatologia da mucosite oral.....	25
<b>Figura 5.</b> Fatores que regulam a colonização e a estabilidade da microbiota intestinal.....	30
<b>Figura 6.</b> Distribuição e composição da microbiota do TGI de populações saudáveis.....	31
<b>Figura 7.</b> Benefícios do consumo de probióticos a saúde humana.....	35
<b>Figura 8.</b> Organograma do método experimental.....	40
<b>Figura 9.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> na leucopenia induzida pelo 5-FU.....	48
<b>Figura 10.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> na variação de peso corporal em comparação ao grupo 5-FU.....	49
<b>Figura 11.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> na diminuição da concentração de GSH nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.....	50
<b>Figura 12.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> no aumento dos níveis de MDA nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.....	52

<b>Figura 13.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> no aumento da expressão de TNF- $\alpha$ nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos....	54
<b>Figura 14.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> no aumento dos níveis de IL-6 nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.....	55
<b>Figura 15.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> no aumento da atividade de MPO nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.....	57
<b>Figura 16.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> ou Probiatop <sup>®</sup> sobre as alterações histopatológicas no duodeno induzidas por 5-FU em camundongos.....	59
<b>Figura 17.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> ou Probiatop <sup>®</sup> sobre as alterações histopatológicas no jejuno induzidas por 5-FU em camundongos.....	59
<b>Figura 18.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> ou Probiatop <sup>®</sup> sobre as alterações histopatológicas no íleo induzidas por 5-FU em camundongos.....	60
<b>Figura 19.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> sobre a redução da razão vilo/crípta induzida por 5-FU em camundongos.....	60
<b>Figura 20.</b> Efeito do tratamento com Probiotil <sup>®</sup> e Probiatop <sup>®</sup> sobre as alterações na atividade permanecida no estômago e intestino induzido por 5-FU em camundongos.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição da Microbiota Intestinal.....	29
<b>Tabela 2.</b> Escores histopatológicos nos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com Probiotil® .....	58
<b>Tabela 3.</b> Escores histopatológicos nos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com Probiatop® .....	58

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Microrganismos com propriedades de probióticos.....	34
<b>Quadro 2.</b> Fármacos utilizados no Experimento.....	41
<b>Quadro 3.</b> Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer.....	45

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
ANOVA	Análise de Variância
Caco-2	Célula de adenocarcinoma de cólon humano
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CCR	Câncer colo-retal
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CRAMPs	Moléculas padrão associadas ao dano endógeno
CXCL1	Quimiocina derivada de queratinócitos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo fosfatado
DPD	Dihidropirimidina desidrogenase
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
DTNB	Ácido 5,5-dithiobis-2-nitro-benzóico
dTTP	desoxitimidina trifosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
dUTP	deoxiuridina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima ( <i>EnzymeLinkedImmunoabsorbent Assay</i> )
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESMO	Sociedade Européia de Oncologia Médica
FAO	Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas
FdUDP	fluorodeoxiuridina difosfato
FdUMP	Fluorodioxuridina monofosfato
FdUTP	Fluorodioxuridina trifosfato
FUDP	fluorouridina difosfato
FUDR	Fluorodeoxiuridina
FUMP	Fluorouridina monofosfato
FUTP	Fluorouridina trifosfato
GSH	Glutathiona

HT-29	Células de Adenocarcinoma de cólon humano
i.p.	Intraperitoneal
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IBS	Síndrome do intestino irritável
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
IκBα	Proteína reguladora que inibe NF-κB
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MPO	Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
MTX	Metotrexato
NF-κB	Fator nuclear Kappa beta
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução tamponada de fosfato
RNA	Ácido Ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Enzima superóxido dismutase
SW480	Linhagem celular de células de câncer de cólon
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TGI	Trato Gastrointestinal
TK	Timidina quinase
TMP	1,1,3,3-Tetraetoxipropano
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
TREGs	Células T regulatórias
TRIS	Tampão tris-hidroximetilaminometano
TS	Timidilato sintetase
UDG	Uracil-DNA glicosilase



UFC	Unidade formadora de colônia
UICC	União Internacional de Controle do Câncer
v.o.	Via oral
OMGE	Organização Mundial de Gastroenterologia
YFN- $\gamma$	Interferon gama

## LISTA DE SÍMBOLOS

\$	Dólar
CH <sub>2</sub> THF	5,10-metileno tetraidrofolato
g	Gramma
h	Hora
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de Hidrogênio
K <sup>+</sup>	Íon Potássio
kg	Quilograma
log	Logaritmo
M	Molar
mg	Miligramma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
mmol	Milimolar
Na <sup>+</sup>	Íon Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
nmol	Nanomolar
NP-SH	Grupo sulfidrílico não-protéico
°C	Graus Celsius
p53	Fator de transcrição envolvido na apoptose
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
UMPO	Unidade de Mieloperoxidase
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μl	Microlitro

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 5-Fluorouracil</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Mucosite Intestinal por 5-FU</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.1 Fases da Mucosite Intestinal por 5-FU</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3 Efeito do 5-FU sobre a microbiota intestinal</b> .....	<b>28</b>
<b>2.4 Probióticos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4.1 Efeitos benéficos de probióticos em doenças do TGI</b> .....	<b>36</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>38</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>39</b>
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1 Organograma do Método Experimental</b> .....	<b>40</b>
<b>5.2 Animais</b> .....	<b>40</b>
<b>5.3 Fármacos utilizados no Experimento</b> .....	<b>41</b>
<b>5.4 Grupos Experimentais</b> .....	<b>41</b>
<b>5.5 Protocolo Experimental</b> .....	<b>42</b>
<b>5.5.1 Modelo de Mucosite Intestinal Induzida por 5-Fu e Tratamento com Probióticos</b> .....	<b>42</b>
<b>5.6 Parâmetros Avaliados</b> .....	<b>42</b>
<b>5.6.1 Leucograma</b> .....	<b>42</b>
<b>5.6.2 Análise Ponderal</b> .....	<b>43</b>
<b>5.6.3 Determinação da Glutathione (GSH)</b> .....	<b>43</b>
<b>5.6.4 Dosagem de Malondialdeído (MDA)</b> .....	<b>43</b>
<b>5.6.5 Dosagem de TNF-<math>\alpha</math> e IL-6</b> .....	<b>44</b>
<b>5.6.6 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)</b> .....	<b>44</b>
<b>5.6.7 Análise Morfométrica e Histopatológica</b> .....	<b>45</b>

<b>5.7 Esvaziamento Gástrico e Trânsito Gastrintestinal na Mucosite Intestinal Induzida por 5-FU em camundongos .....</b>	<b>45</b>
<b>5.8 Análise Estatística .....</b>	<b>46</b>
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
<b>6.1 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a contagem de leucócitos totais nos camundongos. ....</b>	<b>48</b>
<b>6.2 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a análise ponderal nos camundongos. ....</b>	<b>48</b>
<b>6.3 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a concentração de GSH nos segmentos intestinais. ....</b>	<b>49</b>
<b>6.4 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre os níveis de MDA nos segmentos intestinais. ....</b>	<b>51</b>
<b>6.5 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF-<math>\alpha</math> e IL-6, nos segmentos intestinais.....</b>	<b>53</b>
<b>6.6 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a atividade de MPO nos segmentos intestinais. ....</b>	<b>56</b>
<b>6.7 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> na análise histopatológica dos segmentos intestinais. ....</b>	<b>58</b>
<b>6.8 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> sobre a análise morfométrica (relação vilo/cripta) nos segmentos intestinais. ....</b>	<b>60</b>
<b>6.9 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> sobre o esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal nos camundongos. ....</b>	<b>62</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer está relacionado ao termo neoplasia maligna e pode ser definido como um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado e descontrolado de células com propriedades de indiferenciação celular, capazes de invadir tecidos e órgãos, podendo metastasiar para várias regiões do corpo. Sua origem se dá por condições multifatoriais, sendo que, esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (carcinogênese) (BRANDÃO et al., 2010; BRASIL, 2014).

No Brasil, o câncer é considerado a segunda maior causa de morte, com 190 mil óbitos por ano. Estima-se cerca de 600 mil novos casos de câncer para 2016 (BRASIL, 2016). No cenário mundial, o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade prematura, sendo responsável por cerca de 13% de todas as causas de óbito no mundo, mais de 7 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência da doença (UICC, 2009). De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde (OMS), projeta-se que, em 2030, mais de 21 milhões de pessoas serão diagnosticadas e 13 milhões morrerão de câncer anualmente. O maior efeito desse aumento irá incidir em países de baixa e média renda (STEWART; IARC, 2014).

Os tratamentos oncológicos atuais têm como modalidades principais a radioterapia ou quimioterapia isolada ou combinada e/ou associadas à cirurgia (BRANDÃO et al., 2010). Dentre os fármacos quimioterápicos, encontra-se o 5-fluorouracil (5-FU), um antimetabólito considerado análogo da pirimidina, que age inibindo moléculas de DNA e/ou RNA, impedindo a síntese e metabolismo de novas células (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954). No entanto, o tratamento pode ter efeitos colaterais, muitas vezes responsáveis por recusas da terapia, dentre os quais a mucosite, que afeta a maioria dos pacientes que fazem uso do fármaco (WU et al., 2011).

A mucosite é uma reação tóxica inflamatória que afeta todo o trato gastrointestinal, seqüela do tratamento citorrredutivo induzido por radioterapia e/ou quimioterapia e em pacientes submetidos à transplante de medula óssea (SANTOS et al., 2009). Observa-se concomitantemente, lesões orais, vômitos, anorexia, indisposição geral, além de dor abdominal e principalmente, diarreia. Assim, diagnóstico e tratamento apropriados a essas condições são etapas essenciais para a boa condução destes pacientes (SARGENT et al.,

2010; KISSOW et al., 2012). Em vista disso, torna-se importante o estudo de alternativas terapêuticas que possam minimizar o impacto da mucosite em pacientes com câncer.

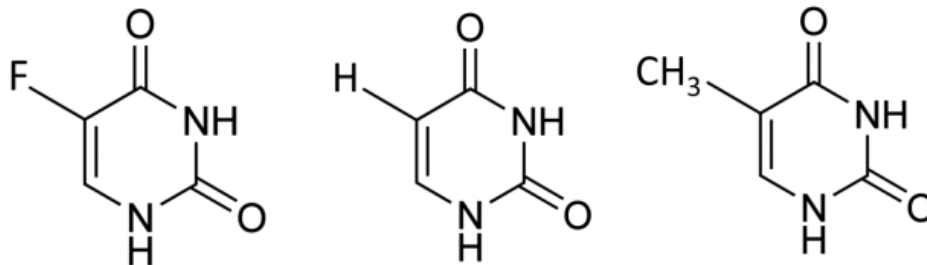
Os probióticos destacam-se como alvos de estudos que buscam minimizar distúrbios associados ao TGI (Trato Gastrointestinal), logo, a frequência de artigos de revisão e de ensaios clínicos randomizados tem mantido o interesse global nesse inovador método de terapia. Inúmeras cepas probióticas foram investigadas quanto à eficácia clínica, incluindo várias cepas de bactérias lactobacilos, bifidobactérias, estreptococos, *Clostridium* e linhagens dos fungos *Saccharomyces boulardii*, *S. cerevisiae*, e *Monascus purpureus* (MCFARLAND, 2009; CZERUCKA et al., 2007; ELMER; SURAWICZ; MCFARLAND, 1996). Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito anti-inflamatório de probióticos compostos por *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium sp.* sobre a mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 5-Fluorouracil

O 5-Fluorouracil é uma pirimidina fluorada, preparada a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por um de flúor, mais estável, na posição cinco da molécula de uracil (Figura 1). O sítio de substituição no anel pirimidina foi selecionado para inibir a conversão do nucleotídeo uracil em timidina (PINEDO; PETERS, 1988).

**Figura1.** Estruturas químicas do 5-FU, uracila e timina. Ordenadas da esquerda para a direita.

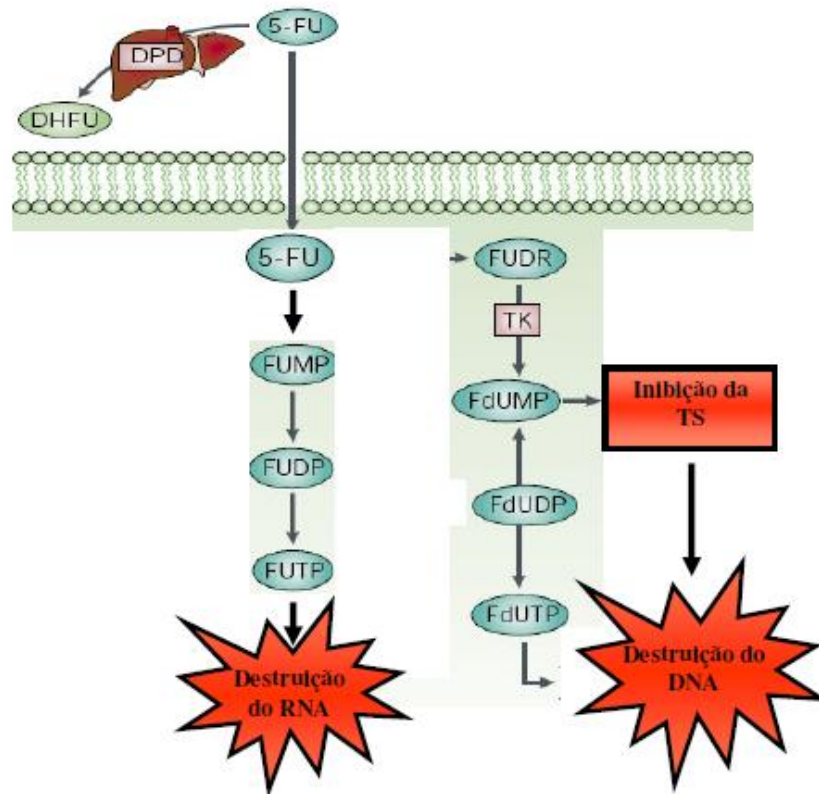


**Fonte:** Adaptado de Longley, Harkin e Johnston (2003).

Logo, o 5-FU é um agente quimioterápico antimetabólito pertencente ao subgrupo dos fármacos análogos da pirimidina, desenvolvido na década de 50 do século passado, tem a função de inibir moléculas de DNA e/ou RNA, impedindo a síntese e metabolismo de novas células (RUTMAN; CANTAROW; PASCHKIS, 1954). Atua inibindo a atividade da enzima timidilato sintetase, reduzindo a produção do nucleotídeo timina; ou sendo incorporado ao DNA e/ou RNA das células, impossibilitando seu funcionamento normal e induzindo apoptose (LONGLEY, HARKIN; JOHNSTON, 2003; SAVVA-BORDALO et al., 2010).

A citotoxicidade desta droga é atribuída a três diferentes mecanismos: incorporação de fluoro trifosfato (FUTP) no RNA; incorporação de fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) no DNA genômico e inibição da enzima timidilato sintetase (TS) relacionado à síntese de nucleotídeos (Figura 2) (GREM, 1997; LONGLEY et al., 2004; NOORDHUIS et al., 2004; HARRIS et al., 2005).

**Figura 2.** Metabolismo hepático do 5-Fluorouracil.



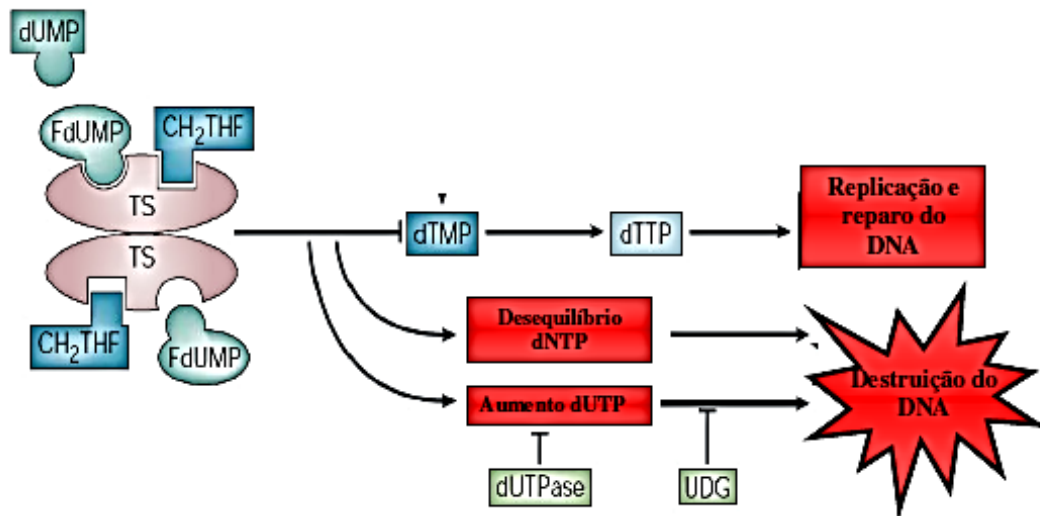
**Fonte.** Adaptado de Longley, Harkin e Johnston (2003).

5-FU – 5-Fluorouracil; DPD – diidropirimidina desidrogenase; DHFU – dihidrofluorouracil; FUMP – monofosfato de fluorouridina; FUDP – difosfato de fluorouridina; FUTP – trifosfato de fluorouridina; FdUMP – monofosfato de fluorodeoxiuridina; FdUDP – difosfato de fluorodeoxiuridina; FdUTP – trifosfato de fluorodeoxiuridina; TS – timidilato sintetase; TK – timidina cinase; FUDR - fluorodeoxiuridina.

Acredita-se que o principal mecanismo de citotoxicidade do 5-Fluorouracil seja a inibição da enzima timidilato sintetase, uma vez que, esta é responsável pela conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) utilizando o 5,10-metileno tetra-hidrofolato ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) como um doador de grupos metil, no entanto, na presença do metabólito ativo do 5-FU que é o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), este por sua vez, liga-se ao sítio de ligação do nucleotídeo da enzima TS e forma um complexo estável TS/ $\text{CH}_2\text{THF}$ . 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) (Figura 3) (LONGLEY, HARKIN; JOHNSTON, 2003).



**Figura 3.** Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil sobre a enzima timidilato sintetase.



**Fonte.** Adaptado de Longley, Harkin e Johnston, (2003).

A enzima timidilatosintase (TS) junto ao cofator CH<sub>2</sub>THF (5,10-metilenotetrahidrofolato) converte dUMP a dTMP que por sua vez gera dTTP (trifosfato de deoxitimidina), componente essencial da molécula de DNA. Esquema representativo da ação inibitória do metabólito ativo de 5-FU, FdUMP. FdUMP se liga ao sítio ativo da enzima formando um complexo estável com ela e seu cofator, bloqueando a ligação do composto dUMP e a síntese de dTMP e dTTP, impedindo a síntese e/ou o reparo da molécula de DNA

O 5-FU é utilizado para o tratamento de vários tipos de câncer, incluindo o ovário, cabeça, pescoço, câncer de mama e o de col retal, sendo de maior impacto nesse último tipo (NOORDHUIS et al., 2004). Porém, a ação desse quimioterápico não se limita somente às células neoplásicas. Os efeitos colaterais são mais observados nas células com alto índice mitótico, como os tecidos de rápida proliferação (KIM et al., 2006). Por exemplo, na medula óssea resulta em granulocitopenia, trombocitopenia, no trato gastrointestinal resulta em mucosite oral, mucosite intestinal, faringite, esofagite, gastrite, colite, entre outros (KOENIG; PATEL, 1970). Outros efeitos como alopecia, dermatite, cardiotoxicidade e mais raramente, neurotoxicidade também são efeitos tóxicos observados na utilização do 5-FU (PIRZADA; ALI; DAFER, 2000). Também são relatadas alterações na microflora intestinal, que podem contribuir para a ocorrência da diarreia (SAVVA-BORDALO et al., 2010).

Aproximadamente 40% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam mucosite, podendo chegar a 100% com o uso de altas doses. Isso contribui para a interrupção do tratamento, necessidade de modificação no esquema de administração da droga, 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; BOWEN et al., 2006; STRINGER et al., 2009; VLIET et al., 2010). Devido a esses fatores, torna-se importante a busca por alternativas terapêuticas que visem diminuir ou amenizar os efeitos colaterais como a mucosite intestinal resultante do tratamento quimioterápico com 5-FU.

## **2.2 Mucosite Intestinal por 5-FU**

A mucosa do trato gastrointestinal, devido à alta taxa proliferativa, é particularmente susceptível a complicações durante o tratamento quimioterápico, principalmente pelo uso de fármacos antimetabólitos, uma vez que a inespecificidade destes agentes promovem sua ação também sobre células normais do organismo, principalmente sobre aquelas de intensa atividade mitótica. Por conseguinte, os indivíduos submetidos a quimioterapia, cujos tumores podem ou não ser originários do trato alimentar são considerados grupo de risco para tal evento (SINICROPE; LEVIN, 2000).

A mucosa normal possui a capacidade de substituir continuamente suas células por meio da geração das células-tronco adjacentes à submucosa. Sendo assim, a continuidade e estrutura normal da mucosa dependem da capacidade do tecido em ser substituído de forma contínua (SONIS, 2004). No entanto, em indivíduos submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia, esse processo de regeneração constante da mucosa intestinal é comprometido, resultando em uma reação tóxica inflamatória que afeta todo o trato gastrointestinal, seqüela do efeito citorredutivo induzido pelo tratamento (SANTOS et al., 2009).

Logo, a mucosite induzida por antineoplásico é um fator limitante na terapia anticâncer. Sendo observada em aproximadamente 40% dos pacientes que recebem a dose-padrão de quimioterapia, e 100% dos pacientes que recebem altas doses (KEEFE et al., 2000), comprometendo a adesão ao tratamento em função da citotoxicidade gastrointestinal ocasionada (SONIS, 2004; LOMBARDI et al., 2010).

Geralmente o quadro clínico da mucosite é caracterizado por lesões ulcerativas da mucosa bucal e do trato gastrointestinal, bem como eritema generalizado (GIBSON et al., 2003). As manifestações clínicas frequentes da mucosite são náuseas, vômito, diminuição da ingestão de alimentos, flatulência, dor abdominal, diarreia e ulceração (KHAN; WINGARD, 2001; KEEFE, 2004), enquanto casos graves estão associados com neutropenia febril, sepse e, eventualmente, morte (BLIJLEVENS; SONIS, 2007).

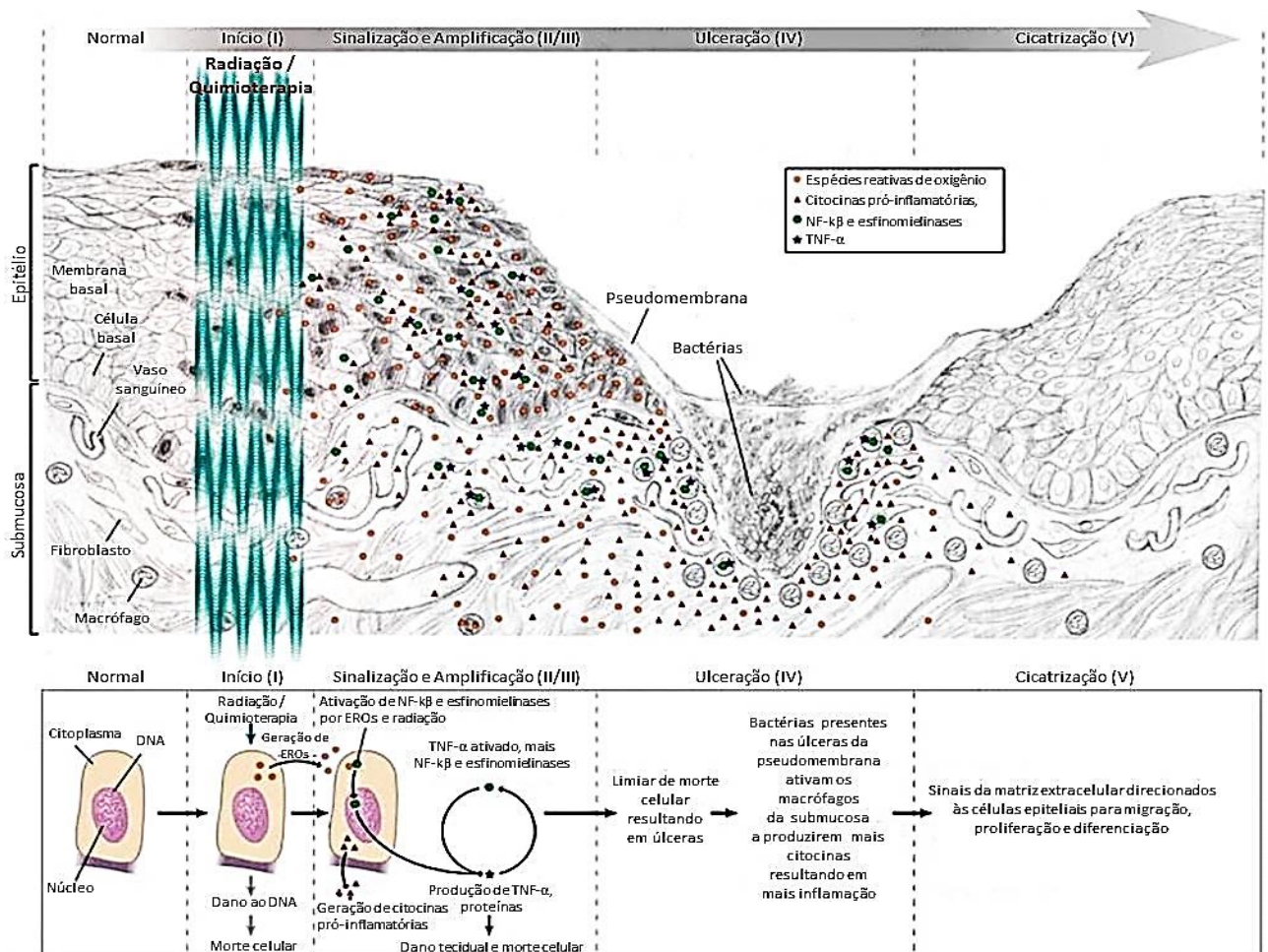
### ***2.2.1 Fases da Mucosite Intestinal por 5-FU***

O exato mecanismo biológico da mucosite intestinal ainda não está totalmente esclarecido (GIBSON; KEEFE, 2006). Sonis (2004) propôs um modelo de cinco fases para descrever o desenvolvimento da mucosite oral, embora, não se possa garantir que essas fases sejam as mesmas para mucosite intestinal, ou que a totalidade dos eventos fisiopatológicos

esteja presente em todos os casos de mucosite, sabe-se que os eventos inflamatórios envolvidos, assim como a recuperação da mucosa, ocorrem mais rapidamente no epitélio intestinal do que no oral (SONIS et al., 2004).

A descrição do modelo em fases proposto por Sonis foi uma forma didática para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos no desenvolvimento da mucosite, entretanto, é importante reconhecer que essa caracterização artificial pode não refletir amplamente os efeitos em processo, uma vez que existe uma dinâmica fluida para o mesmo, bem como uma variabilidade individual (SONIS, 2004). Conforme este modelo, o desenvolvimento da mucosite ocorre em cinco fases: iniciação resposta a danos primários, amplificação de sinais, ulceração e cicatrização (Figura 4).

**Figura 4.** Fisiopatologia da mucosite oral.



**Fonte.** Adaptado de Sonis (2009).

A fisiopatologia da mucosite como um processo de cinco estágios: iniciação; primeira resposta ao dano (mensagem e sinalização); amplificação; ulceração e cicatrização

O processo inicia-se logo após a exposição à radiação ou quimioterapia, ou seja, na fase de iniciação ocorre dano direto ao DNA das células epiteliais basais culminando na

morte celular. Concomitante ao dano tecidual ocorre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), radicais livres que contribuem para um aumento do dano tecidual e que podem iniciar uma cascata de eventos biológicos. Neste primeiro momento a mucosa apresenta aspecto morfológico normal, no entanto começam a ocorrer diversas alterações na submucosa (SONIS, 2004). Mais recentemente, em uma revisão publicada por Villa e Sonis (2015), sugere-se que além do dano causado pelas EROs, as células danificadas por radiação ou quimioterapia possa liberar moléculas padrão associadas ao dano endógeno (CRAMPs), que em seguida, se ligam a receptores específicos para contribuir com o início da segunda fase. Levando a ativação da resposta imune inata e uma série de acontecimentos biológicos, como por exemplo, a ativação do fator nuclear Kappa-B (NF- $\kappa$ B).

Na fase de resposta a danos primários, uma série de mensageiros biológicos são ativados em decorrência do dano causado ao DNA pelo quimioterápico e por EROS. Dentre eles, o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, envolvido na regulação da expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão. Outro fator de transcrição ativado é o p53, envolvido na regulação do ciclo celular e apoptose. A mucosa começa a sofrer alterações, tornando-se mais fina e eritematosa, começando a ser dolorosa para o paciente (SONIS et al., 2004; BOWEN et al., 2006; MAEDA et al., 2010). Recentemente, admite-se que NF- $\kappa$ B pode ser ativado diretamente pela ligação de moléculas padrão associadas ao dano endógeno por quimioterapia e radioterapia (CRAMPs) ao seu receptor específico, ou indiretamente pelo aumento de EROs no tecido (VILLA; SONIS, 2015).

A molécula NF- $\kappa$ B é crucial para a fase de amplificação de sinal, uma vez que age na regulação da expressão de diversos genes, a maioria dos quais potencialmente exercem efeito na toxicidade da mucosa, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-1 $\beta$  e IL-6. Além disso, a ativação de NF- $\kappa$ B estimula a expressão da enzima óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), com consequente produção de NO, exacerbando a lesão, levando à perda da integridade da mucosa (AKTAN, 2004; LEITÃO et al., 2011).

O processo inflamatório instaurado culmina na fase de ulceração, estágio em que a integridade da mucosa é perdida. Conforme observado por Ferreira et al. (2012), a mucosite intestinal induzida por 5-FU acarreta em alterações na arquitetura da mucosa, com redução do comprimento do intestino delgado, redução das vilosidades e presença de ulcerações. Corroborando com estes achados, Soares et al. (2013) observaram encurtamento das vilosidades e aumento da profundidade das criptas na mucosite intestinal induzida pelo mesmo quimioterápico. Essa 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  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , que pode resultar em diarreia (KEEFE; GIBSON; HAUER-JENSEN, 2004; CARNEIRO-FILHO et al., 2004)

Além disso, a fase de ulceração representa um grande risco de infecção ao paciente, uma vez que bactérias colonizam a superfície ulcerada e liberam substâncias tóxicas na parede celular que irão penetrar o tecido adjacente e estimular diretamente macrófagos infiltrantes que liberam mais citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para uma maior resposta inflamatória, que acarretará em um maior dano tecidual (VILLA; SONIS, 2015).

Assim, a presença de infiltrado polimorfonuclear também é característica dessa fase (SONIS et al., 2004), não só por ativação de células inflamatórias por produtos da parede celular dos microrganismos, como também pela maior expressão de moléculas de adesão pela ativação de NF- $\kappa$ B e os produtos das reações das EROs, que culminam em uma maior atração de neutrófilos circulantes, estimulando a produção de oxidantes por essas células (van YE; ROZA, PIEPER, 1993). A mucosite intestinal por 5-FU em modelos experimentais já foi associada ao acúmulo de infiltrado neutrofílico tecidual (FERREIRA et al., 2012; SOARES et al., 2013). A presença de polimorfonucleares também implica na ocorrência de diarreia, pois, conforme mostrado por Madara et al (1993), estes, 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). Logo, o processo inflamatório estabelecido trará grande impacto sobre as células epiteliais intestinais e sobre células especializadas do intestino, como as células produtoras de muco e as células enteroendócrinas (NASH; STAFFORD; MADARA, 1987; PARSONS et al., 1987), podendo causar um prejuízo na função de barreira, uma vez que, sua ação sobre as *tight junctions*- junções apertadas e justas entre as membranas laterais das células -pode promover um aumento da permeabilidade, dificultando a absorção (NUSRAT et al., 1997; SEIDLER et al., 2006).

Por fim, a fase de cicatrização acontece de forma espontânea, ao término do tratamento. A proliferação celular é estimulada por novos mensageiros da matriz extracelular que migram para a superfície ulcerada, estimulando a diferenciação no tipo especializado de epitélio da mucosa. Desta forma, a úlcera é recoberta pelo epitélio e o tecido começa a formar as camadas, possibilitando a regeneração da arquitetura normal da mucosa. Ocorre, ainda, restabelecimento da microbiota intestinal (SONIS, 2004).

Além das alterações inflamatórias, Soares et al. (2008) demonstraram que durante a mucosite intestinal por 5-FU ocorre uma alteração no padrão contrátil do intestino, caracterizado pela hiper-reatividade do músculo intestinal a agonistas como o carbacol, revelando uma alteração funcional do intestino, presente tanto na fase inflamatória como na pós-inflamatória.

Logo, há uma complexidade biológica inerente ao modelo de mucosite, a compreensão dos mecanismos envolvidos em tal fenômeno é necessária para que se possa propor novas abordagens clínicas, sugerindo novos alvos para o tratamento, de forma a melhorar o entendimento do processo e selecionar a fase apropriada para a intervenção nos pacientes (SONIS, 2004). Sabe-se que o controle e prevenção desses sintomas são de suma importância, uma vez que podem limitar o tratamento, levar à necessidade de sua interrupção, reduzir a motivação do paciente em prosseguir com o plano de tratamento e comprometer o controle local do tumor e as taxas de sobrevida (BRITO et al., 2012).

Desta forma, nos últimos anos mucosite intestinal tem sido foco de muitos estudos que possibilitaram além de uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares, possíveis formas de prevenção e tratamento (PETERSON; BENSADOUN; ROILA, 2011). Nos quais, fatores de crescimento, citocinas e antagonistas, além de probióticos e diversos nutrientes são alguns dos alvos de estudo na área (VON BÜLTZINGSLÖWEN et al., 2006; KEEFE, 2007; SULTANI et al., 2012).

Um dos fatores que vêm sendo bastante investigado como um dos mecanismos envolvido no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos é a alteração da microbiota intestinal, uma vez que este efeito pode promover um desequilíbrio na homeostase do organismo e contribuir para os efeitos adversos gastrintestinais associados ao tratamento quimioterápico (SAVVA-BORDALO et al., 2010; STRINGER et al., 2008; VON BULTZINGSLOWEN et al., 2003).

### **2.3 Efeito do 5-FU sobre a microbiota intestinal**

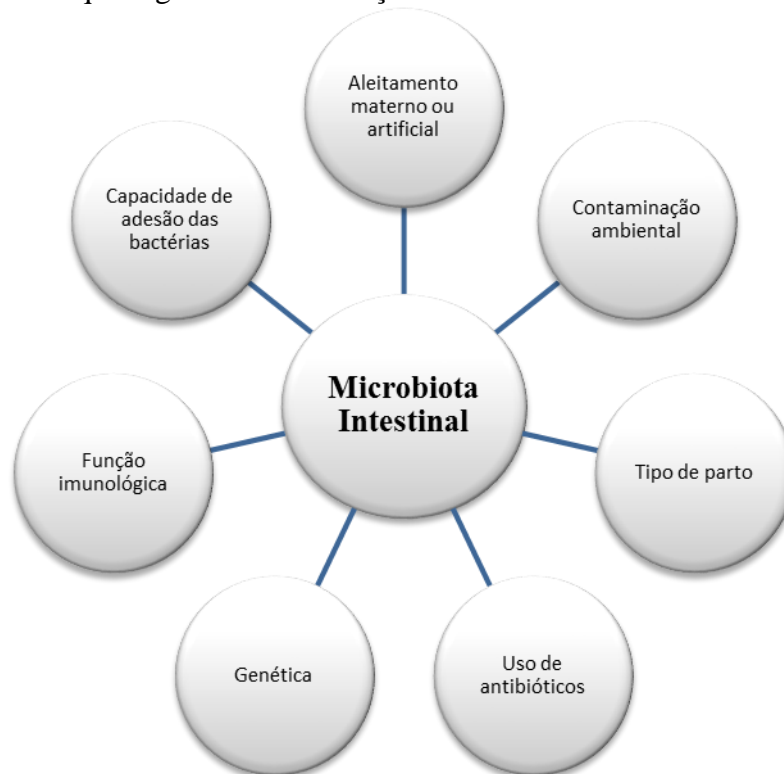
O intestino humano abriga trilhões de microrganismos residentes que constituem um dos ecossistemas mais complexos da Terra (BACKHED et al., 2005; GILL et al., 2006; TURNBAUGH ET AL et al., 2007), formado por bactérias aeróbicas e anaeróbicas, gram-positivas e gram-negativas (Tabela 1) (SIMON; GORBACH, 1982).

**Tabela 1 .**Composição da Microbiota Intestinal.

Organismo	Estômago	Intestino Delgado	Intestino Grosso	Fezes
Coco Gram Positivo	++	++	++	++
Aeróbico	++	++	++	++
Anaeróbico	+	+	+++	+++
Enterobactérias	+	+	+++	+++

**Fonte.** Adaptado de Simon e Gorbach (1982).

A microbiota intestinal do indivíduo começa a ser formada logo após o nascimento, o intestino que era estéril, na primeira semana de vida passa a ser colonizado por bactérias anaeróbias facultativas, tais como enterobactérias e enterococos, seguidas por bactérias mais estritamente anaeróbias como bifidobactérias. Sendo que, essa colonização vai sofrer influência de fatores ambientais, alimentares, associados aos microrganismos e relacionados ao hospedeiro (Figura 5). Acredita-se que essa primeira colonização seja um pré-requisito para subsequente colonização por bactérias anaeróbias estritas, pois, a colonização inicial do intestino por bactérias anaeróbias facultativas leva a uma redução do potencial redox no lúmen intestinal (BRANDT et al., 2006; KELLY; KING; AMINOV et al.,2007).

**Figura 5.** Fatores que regulam a colonização e a estabilidade da microbiota intestinal.

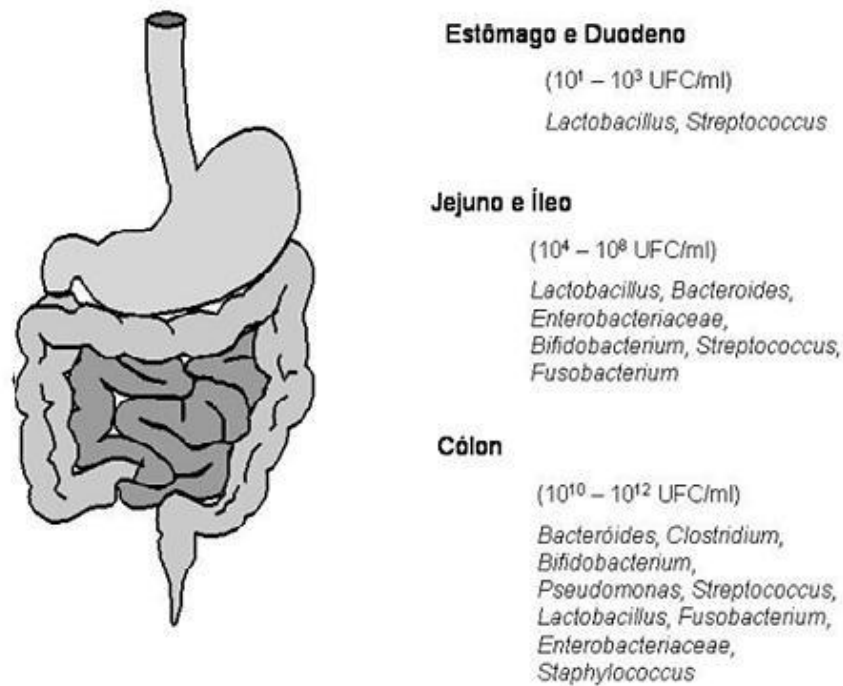
**Fonte.** Adaptado de Brandt et al. (2006).

Esses microrganismos vivem em relação simbiótica e mutualística com o hospedeiro, desta forma, exercem funções antibacterianas, metabólicas, nutricionais e imunomoduladoras (ISOLAURI et al., 2004; BRANDT et al., 2006).

A distribuição da microbiota ao longo do TGI ocorre de forma heterogênea (BRANDT et al., 2006), por exemplo, a microbiota do estômago é constituída predominantemente por microrganismos advindos da cavidade oral, que são deglutidos juntamente com saliva e partículas alimentares. O estômago e o duodeno são ambientes desfavoráveis para a colonização e proliferação bacteriana devido a ação do suco gástrico e ao intenso peristaltismo da região. O íleo é um sítio de transição bacteriológica, entre a escassa população bacteriana do jejuno e a densa microbiota do cólon. No cólon as bactérias encontram condições favoráveis para sua proliferação devido ao peristaltismo lento e abundante suprimento nutricional (BRANDT et al., 2006; LUTGENDORFF; AKKERMANS; SÖDERHOLM, 2008). Ao todo, o TGI é colonizado por mais de 400 espécies de enterobactérias não-patogênicas, a figura abaixo apresenta as espécies mais frequentes, bem como a distribuição e concentração ao longo TGI (Figura 5) ( TRABULSI; SAMPAIO, 2004).



**Figura 6.** Distribuição e composição da microbiota do TGI de populações saudáveis.



**Fonte.** Adaptado de Trabulsi e Sampaio (2004).

Sugere-se que as alterações induzidas na microbiota intestinal pela quimioterapia são capazes de interromper a homeostasia do organismo, tendo em vista a atuação da microbiota em vários mecanismos necessários a essa manutenção, como, metabolismo de bilirrubina, mucinas intestinais, enzimas pancreáticas, ácidos graxos, ácidos biliares, colesterol e hormônios esteroidais, além de combater o crescimento de patógenos e atuar como imunomodulador. O rompimento destas funções importantes pode contribuir para os danos causados por agentes quimioterápicos. Além de propiciar um desequilíbrio microbiológico que favorece um crescimento excessivo de patógenos, acarretando uma translocação bacteriana (GUSTAFSSON, 1982; DAI; WALKER, 1999).

Vários estudos já realizados visam destacar o importante papel da microbiota intestinal residente. Hooper e Gordon (2001) investigaram o papel da microbiota sobre a função intestinal. Em modelo de camundongo gnotobiótico (isento de germes colonizado com bactérias conhecidas), esses pesquisadores conseguiram demonstrar mudanças e maturação na função intestinal medidas pela expressão dos genes de uma série de marcadores relacionados com a nutrição, com a função de barreira, com angiogênese e com a diferenciação celular intestinal relacionada à função imunológica. Em outro estudo realizado em modelo de animais isentos de germes (*germ-free*), observou-se que a mucosa intestinal apresentou baixa

densidade de células linfóides, baixo número de placas de Peyer com dimensões reduzidas e mínima concentração de imunoglobulinas circulantes. Após a colonização destes animais com microrganismos observou-se desenvolvimento do sistema imunológico local, com aumento das placas de Peyer, dos linfócitos intraepiteliais e das imunoglobulinas circulantes (MACPHERSON; HARRIS, 2004). Demonstrando assim a importância da microbiota residente intestinal no desenvolvimento da homeostase do sistema imunológico do hospedeiro (OHASHI; USHIDA, 2009).

Diante da importância da microbiota intestinal, von Bultzingslowen et al. (2003) investigaram o impacto do tratamento com 5-FU sobre esta, onde verificaram que o tratamento com o quimioterápico induzia um aumento nos níveis de bactérias anaeróbicas da cavidade oral de ratos submetidos ao tratamento, no entanto, esses níveis permaneceram inalterados tanto no intestino delgado, como no intestino grosso. Outro estudo demonstrou um aumento na proporção de bastonetes gram-negativos na cavidade oral, sendo que, nos intestinos houve uma mudança a partir de bactérias gram-positivas para gram-negativas (MACDONALD, 1997). Mais recentemente, Stringer et al. (2008) demonstraram que não há alteração na microbiota fecal de ratos após a exposição a 5-FU. No entanto, verifica-se diminuição de *Bacteroides* spp. *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp. após tratamento com 5-FU.

Baseado nos dados expostos acima pode-se afirmar que o tratamento com 5-FU, induz uma alteração na microbiota residente (disbiose intestinal), e que essa alteração pode está ligada aos danos gastrintestinais observados como efeitos colaterais no tratamento com 5-FU. Por conseguinte, o estudo de alternativas terapêuticas que possam influenciar benéficamente a microbiota intestinal, têm se tornado alvo de pesquisas que combatam doenças que acometam o TGI. Nesse contexto, os probióticos são especulados como uma dessas possíveis alternativas.

## **2.4 Probióticos**

O termo “*probiótico*” deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Este termo foi citado pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell, que na ocasião o utilizaram para designar um fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos. Ao longo do tempo, esta denominação teve diferentes acepções, Fuller em 1989, introduziu o requisito de viabilidade

para os probióticos, definindo-os como suplementos alimentares que contêm bactérias vivas que produzem efeitos benéficos no hospedeiro (OMGE, 2008). Atualmente, o conceito estabelecido pela Organização Mundial de Saúde e Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas, define probiótico como sendo microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2002).

Para que um microrganismo seja considerado probiótico ele deve atender a alguns requisitos: deve ser inócuo, manter-se viável durante a estocagem e transporte, sobreviver ao pH do lúmen gástrico, à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal. Além disso, não deve transportar genes transmissores de resistência a antibióticos, bem como exercer benefícios ao sistema imunológico e a saúde em geral do hospedeiro, como por exemplo, competir por nutrientes e sítios de adesão com microrganismos patógenos (HAVENAAR et al., 1992; SALMINEN; OUWEHAND; ISOLAURI, 1998; SAARELA et al., 2000; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

Os microrganismos considerados probióticos, não são colonizadores perenes e não se multiplicam rapidamente, é necessário doses constantes para se alcançar a eficácia do probiótico (MARCO, PAVAN, KLEEREBEZEM, 2004). Considera-se que para esses microrganismos exercerem efeitos benéficos ao hospedeiro, seu nível populacional intestinal após diluição pelas secreções deve ser da ordem de  $10^7$  UFC/g de conteúdo fecal, logo, na preparação inicial consumida diariamente, a quantidade de probiótico deve ser de cerca de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  UFC/dia, especialmente devido aos possíveis efeitos gástricos e duodenais (DUGGAN et al., 2002).

Vários microrganismos são usados como probióticos, entre eles bactérias ácido-láticas, bactérias não ácido láticas e leveduras (Quadro 1) (HOLZAPFEL et al., 2001).

**Quadro 1.** Microrganismos com propriedades de probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas	Bactérias não ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus var.toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli cepa nissle</i>
<i>L.casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propioni bacterium freudenreichii</i>
<i>L.crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pedicoccus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L.gallinarum</i>	<i>B.lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L.gasseri</i>	<i>B.longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnssonii</i>			
<i>L.paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

**Fonte.** Adaptado de Holzapfel et al. ( 2001).

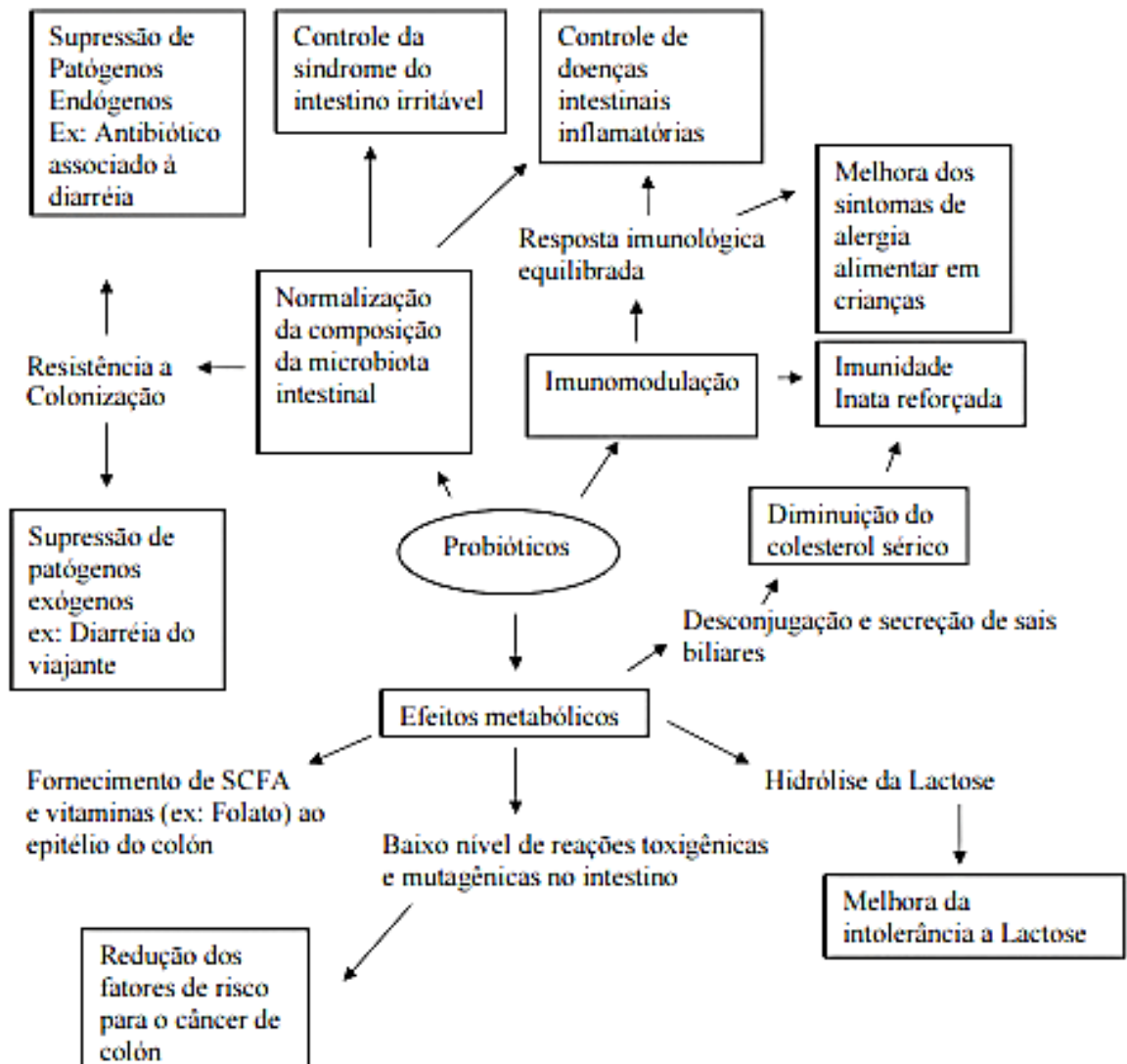
Os microrganismos probióticos utilizados neste estudo estão dentre as espécies mais utilizadas, sendo elas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, todas pertencentes ao grupo de bactérias ácido lácticas.

Apesar do modo de ação dos probióticos ainda não está completamente esclarecido, vários benefícios à saúde humana são atribuídos ao seu consumo (Figura 7) (SHERMA; OSSA; JOHNSON-HENRY, 2009). Eles podem influenciar a microbiota intestinal, a função da barreira intestinal e o sistema imunológico da mucosa exercendo seus efeitos sobre vários tipos de células envolvidas na resposta imunológica inata e adaptativa, tais como macrófagos, células B, células T, e células NK (NG et al., 2009).

A competição com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes promove a exclusão competitiva de patógenos. A síntese de bacteriocinas, de ácidos orgânicos voláteis e de peróxido de hidrogênio por probióticos contribuem para este efeito de exclusão

(COPPOLA; GIL-TURNES, 2004; NG et al., 2009). Sua ação sobre a mucosa intestinal, como fortalecimento das junções intestinais do tipo *tight* (junções entre os enterócitos) e aumento da secreção de muco, contribuem para homeostasia da mucosa (RESTA-LENERT; BARRETT, 2003; LUTGENDORF; AKKERMANS; SÖDERHOLM, 2008; NG et al., 2009).

**Figura 7.** Benefícios do consumo de probióticos a saúde humana



Fonte: Sherman, Ossa e Johnson-Henry (2009).

Os mecanismos de ação dos probióticos, assim como seus efeitos, são bastante semelhantes àqueles propostos para a microbiota intestinal autóctone (MARTINS et al., 2005a). Neste sentido, vários estudos têm sido realizados a fim de avaliar o efeito de probióticos sobre doenças que acometem o TGI, bem como investigar os mecanismos de ação para execução dos seus efeitos.

### 2.4.1 Efeitos benéficos de probióticos em doenças do TGI

As espécies avaliadas no presente estudo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, foram ferramentas de pesquisa em estudos que investigaram seus efeitos frente a estímulos nocivos que mimetizam condições de doenças inflamatórias do TGI, como mucosite, colite e infecção por patógenos (TOUMI et al., 2014; JUSTINO et al., 2015; GAO et al., 2015; SIMEOLI et al., 2015; PHILIPPE et al., 2011).

Na mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU, *Lactobacillus acidophilus* demonstrou ser capaz de diminuir a lesão intestinal pela imunomodulação do processo inflamatório, por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e da quimiocina CXCL-1 (JUSTINO et al., 2015). Em modelo de colite experimental induzida por dextran-sulfato de sódio, o tratamento com este probiótico promoveu uma melhora nos sintomas e uma redução dos escores histológicos associados à capacidade imunomoduladora deste probiótico sobre a produção de NO e YFN- $\gamma$  mediado pela inibição de receptor *toll-like*4 (TLR4), iNOS e NF- $\kappa$ B (TOUMI et al., 2014). Estudos *in vitro* confirmam a capacidade de inibição de NF- $\kappa$ B, regulado por TGF- $\beta$  em células humanas Caco-2 estimuladas com *Salmonella* (HUANG et al., 2015).

*Lactobacillus rhamnosus* demonstrou ação anti-inflamatória prevenindo o aumento de citocinas pró-inflamatórias e minimizando o dano tecidual sobre a mucosa em modelo de mucosite experimental induzido por 5-FU (YEUNG et al., 2015). A propriedade imunomoduladora deste lactobacilo pode estar relacionada à sua capacidade de aliviar a inflamação na barreira epitelial por inibição da sinalização de NF- $\kappa$ B (LEE et al., 2012; DONATO et al., 2010). Esta atividade também foi demonstrada na inflamação por LPS em células epiteliais intestinais (IECS), onde observou-se a redução de citocinas inflamatórias IL12, IL-6 e TNF- $\alpha$ , moduladas por receptores *toll-like* (TLR2, TLR4, TLR9) e consequente inibição da sinalização MAPK e NF- $\kappa$ B (GAO et al., 2015). Efeito anti-inflamatório também foi observado pela capacidade de regulação positiva dos receptores para a IL-10 em modelo de enterocolite necrosante (MIRPURI et al., 2012).

*Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis* também foram avaliados em modelo de colite experimental. *L. paracasei* demonstrou preservar a integridade da barreira epitelial intestinal, bem como suas barreiras de proteção (secreção de muco e moléculas antimicrobianas). A atividade anti-inflamatória foi mediada pela redução de TNF- $\alpha$ , prostaglandina-endoperóxido sintetase 2 (PGHS-2) e estresse oxidativo, aumentos nos níveis

de IL-10 também foram constatados como parte do seu efeito (SIMEOLI et al., 2015). A atividade imunomoduladora também foi observada para *Bifidobacterium lactis*, que promoveu a redução níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e fatores de transcrição relacionados ao dano tecidual, bem como aumentou a expressão de células T reguladoras (PHILIPPE et al., 2011).

Estudos clínicos utilizando probióticos em associação à tratamentos quimioterápicos têm demonstrado que essa alternativa terapêutica promove uma atenuação da toxicidade gastrointestinal associada, refletindo em uma diminuição da severidade da diarreia relatada em pacientes sob terapia antineoplásica (MEGO et al., 2015; CIORBA et al., 2015).

De um modo geral, probióticos têm demonstrado exercer efeitos benéficos como a redução apoptótica de enterócitos (KHAILOVA et al., 2010), modulação da inflamação (PHILIPPE et al., 2011) e manutenção da função de barreira (UENO et al., 2011). Sugerindo que a terapia à base de probiótico poderia ser uma estratégia terapêutica eficaz no tratamento de doenças no TGI.

### 3 JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal é considerada um fator limitante do tratamento antineoplásico, Cerca de 40% dos pacientes tratados com 5-FU apresentam esta reação citotóxica, podendo chegar a 100% com o uso de altas doses, contribuindo para a interrupção do tratamento, necessidade de modificação no esquema de administração da droga, 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 (STRINGER et al., 2009).

De acordo com uma pesquisa realizada com pacientes sob tratamento quimioterápico, observou-se que a mucosite está dentre os principais efeitos secundários para provocar o abandono do tratamento, correspondendo à cerca de 15% dos abandonos (KHANNA; ANGER, 2014). Outros estudos revelam que a mucosite intestinal é responsável por 45% das reduções de doses quimioterápicas, 71% dos atrasos na terapia e 64% da redução da intensidade da dose (LALLA; PETERSON, 2006; GOLDBERG et al., 2005).

Além das alterações no tratamento quimioterápico, a mucosite intestinal acarreta um grande impacto financeiro sobre os gastos em saúde pública, uma vez que na sua presença há a necessidade de cuidados de suporte (nutrição parenteral, reposição de fluidos e profilaxia contra infecções) que acabam por aumentar consideravelmente o custo total do tratamento. Por exemplo, o custo de hospitalização por paciente sob terapia de tumores sólidos ou linfoma é em torno de US\$ 3893,00 por ciclo de quimioterapia, o que aumenta para US\$ 6277,00 em pacientes com mucosite oral e até US\$ 9132,00 para os que desenvolvem mucosite oral e mucosite intestinal (ELTING et al., 2003).

Neste sentido, na busca por alternativas de associações medicamentosas que visem a diminuição de repercussões gastrintestinais adversas, como a mucosite intestinal, consequente do efeito adverso do tratamento quimioterápico com antineoplásicos, tais como o 5-FU, o uso de probióticos têm sido cada vez mais investigado.

Conforme demonstrado na revisão de literatura do presente estudo, os probióticos são estudados como possíveis ferramentas terapêuticas ao combate de doenças inflamatórias do TGI em modelos experimentais, bem como em estudos clínicos. A combinação de diferentes espécies de microorganismos probióticos também tem sido demonstrada como uma alternativa para a potencialização dos efeitos benéficos dos probióticos frente a situações de distúrbios gastrintestinais.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito do tratamento de dois produtos comerciais, Probiotil<sup>®</sup> composto por *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*; e Probiatop<sup>®</sup> composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis* na resposta inflamatória e nas alterações funcionais no curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos.

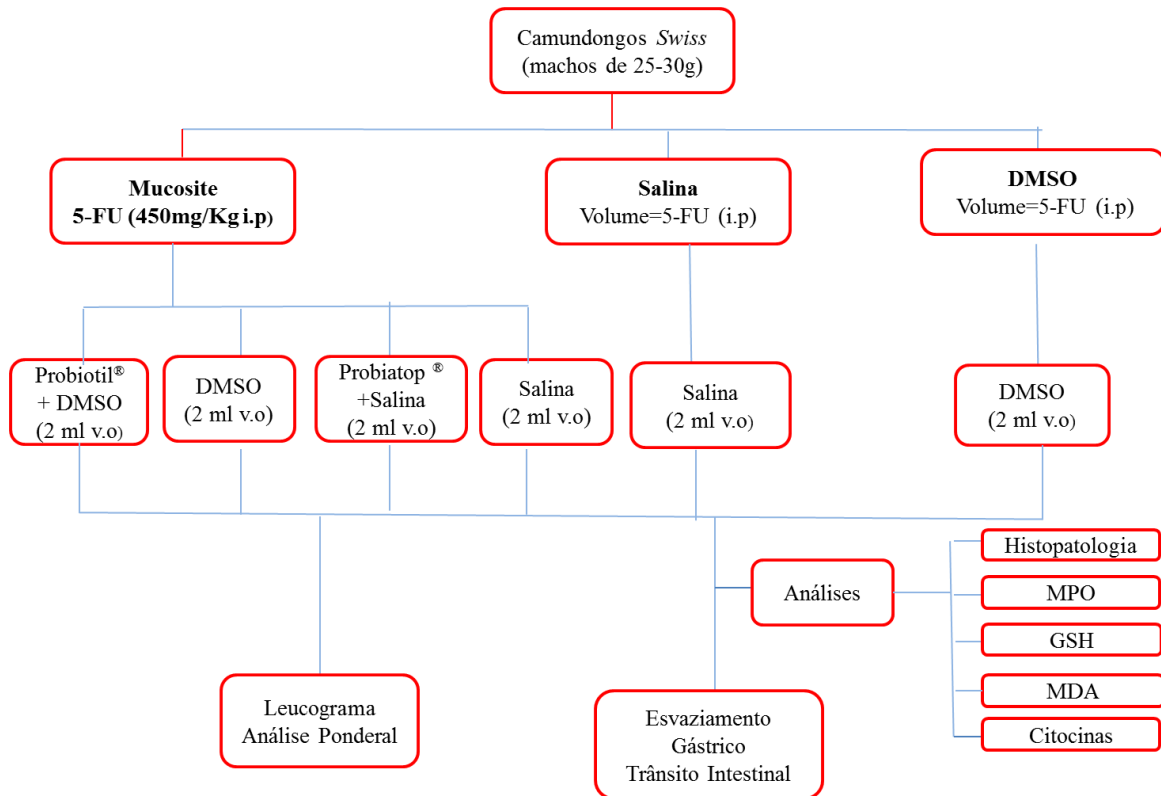
### 4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento de Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a contagem total de leucócitos.
- Avaliar o efeito do tratamento de Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a análise ponderal dos animais
- Avaliar o efeito do tratamento de Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a histopatologia (escores histopatológicos) e morfometria (relação vilo/cripta) dos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo).
- Avaliar o efeito do tratamento de Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre o estresse oxidativo, através da mensuração de antioxidante endógeno (GSH) e de produtos da peroxidação lipídica (MDA).
- Avaliar o efeito do tratamento de Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre parâmetros inflamatórios, através da análise da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) e do infiltrado neutrofílico (MPO).
- Avaliar o efeito do tratamento de Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre aspectos funcionais, através da análise de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Organograma do Método Experimental

**Figura 8.** Organograma do método experimental.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

### 5.2 Animais

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

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram realizados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC (Protocolo nº 87/2015) (Anexo A).

### 5.3 Fármacos utilizados no Experimento

**Quadro 2.** Fármacos utilizados no Experimento.

<b>Fármaco</b>	<b>Descrição</b>
5-Fluorouracil	É um fármaco antineoplásico que atua evitando a disseminação e auxilia o tratamento de células cancerígenas. Eurofarma.
Probiotil <sup>®</sup>	É um probiótico composto por cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> SD5221 NCFM <sup>®</sup> e <i>Bifidobacterium lactis</i> SD5674 HN019 <sup>®</sup> , ambos na proporção de 10 <sup>9</sup> Unidades Formadoras de Colônia –UFC por comprimido. Invictus Brasil /FQM.
Probiatop <sup>®</sup>	É um probiótico composto por cepas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> SD5221 NCFM <sup>®</sup> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> SD5675 HN001 <sup>®</sup> , <i>Lactobacillus paracasei</i> SD5275 <sup>®</sup> e <i>Bifidobacterium lactis</i> SD5674 HN019 <sup>®</sup> , todos na concentração de 10 <sup>9</sup> UFC por sachê. Invictus Brasil/FQM.

**Fonte.** Elaborado pela autora.

### 5.4 Grupos Experimentais

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n= 5-8, por grupo). Foram utilizadas duas drogas testes, sendo que cada uma foi diluída em um tipo de veículo. O Probiotil<sup>®</sup> é vendido na forma de comprimido, portanto, foi macerado e posteriormente diluído em DMSO 3%, tendo em vista que sua diluição em salina era inviável devido a suas propriedades. O Probiatop<sup>®</sup> é vendido na forma de sachê e foi diluído em salina. Assim sendo, a organização dos grupos experimentais se deu da seguinte forma:

- Grupo 5-FU/Salina
- Grupo 5-FU/Probiatop<sup>®</sup>
- Grupo Salina/Salina
- Grupo 5-FU/DMSO
- Grupo 5-FU/Probiotil<sup>®</sup>
- Grupo DMSO/DMSO

## **5.5 Protocolo Experimental**

### ***5.5.1 Modelo de Mucosite Intestinal Induzida por 5-Fu e Tratamento com Probióticos***

A indução da mucosite aconteceu no primeiro dia, onde todos os animais foram tratados com uma dose única intraperitoneal de 5-FU (450 mg/kg), exceto aqueles considerados controles negativos que receberam salina ou DMSO3% (450 mg/kg). Uma hora após a indução, os grupos foram pós-tratados com os devidos probióticos ou veículos via oral. Cada animal recebeu o respectivo a 1 comprimido ou 1 sachê do respectivo probiótico, que foi diluído em 2mL do veículo adequado, sendo que esse tratamento foi dividido em 4 administrações de 0,5mL, no intervalo de 40 minutos a cada administração. O tratamento com probióticos aconteceu 1h, 24h e 48h após a indução de mucosite intestinal. 72h Após a administração do 5-FU, todos os animais foram anestesiados com tribrômio (100µl/10g), amostras de sangue periférico foram coletadas diretamente do globo ocular para a contagem total de leucócitos plasmáticos. Posteriormente, todos os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, e fragmentos de duodeno, jejuno e íleo foram retirados para análise morfológica e histopatológica. Em seguida, segmentos do intestino delgado foram retirados e congelados no freezer à -80°C para posterior dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), da concentração de grupos sulfidrílicos (GSH), dosagem de malondialdeído (MDA) e da citocina TNF- $\alpha$ . (SOARES et al.,2008).

## **5.6 Parâmetros Avaliados**

### ***5.6.1 Leucograma***

O número total de leucócitos plasmáticos foi determinado depois da diluição com solução de Turk (Acido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%). A contagem dos leucócitos plasmáticos foi realizada com o auxílio da câmara de Neubauer juntamente com o uso de microscópio ótico (100X). Os resultados foram expressos como número total de leucócitos contados nos quatro campos da câmara de Neubauer e posteriormente multiplicados pelo fator de correção da câmara. Por fim, os valores foram expressos como n<sup>o</sup>células/mm<sup>3</sup> (SOARES et al.,2008).

### **5.6.2 Análise Ponderal**

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

### **5.6.3 Determinação da Glutathiona (GSH)**

A glutathiona é um antioxidante endógeno que é consumido na presença de estresse oxidativo, desta forma, redução dos seus níveis está relacionada a presença de estresse oxidativo (MEISTER, 1974). A concentração de GSH nos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foi avaliada utilizando o ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (NP-SH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). As amostras obtidas dos segmentos intestinais (100mg/ml) foram homogeneizadas em 0,02 M EDTA. Alíquotas de 40 µl do homogenato foram misturadas com 50 µl de H<sub>2</sub>O destilada e 10 µl de ácido tricloroacético a 50% para precipitação das proteínas. Depois dessa etapa o material foi centrifugado por 15 min em rotação de 5000 rpm à uma temperatura de 4°C. Já na placa, alíquotas de 60 µl do sobrenadante foram misturadas com 102 µl da solução de leitura que era composta por 25ml de tampão TRIS com concentração de 0,4 M, pH 8.9 e com 650 µl 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Fluka). A placa foi lida em ELISA a 412 nm . A concentração de GSH foi expressa por µg/mg de tecido a partir de uma curva padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968) .

### **5.6.4 Dosagem de Malondialdeído (MDA)**

A presença de estresse oxidativo tem como alvo o ataque aos ácidos graxos dos lipídios da membrana, culminando com o aumento de produtos da peroxidação lipídica, incluindo o malondialdeído, desta forma, aumento nos níveis de MDA estão relacionados a um maior estresse oxidativo (BETTERIDGE, 2000). Para quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA) foi realizado o método do TBARS adaptado por Lowry et al. (1951). Os fragmentos foram homogeneizados em KCl gelado (10mg tecido/100µl) e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado para a análise dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico. Adicionou-se 500µL de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl 0,25 N) aos sobrenadantes dos fragmentos de duodeno, jejuno e íleo (250µL cada). As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e, então,

colocadas em água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750 $\mu$ L de n-butanol, e os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados à placa de 96 poços 200 $\mu$ L do sobrenadante, em duplicata. 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.

#### ***5.6.5 Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-6***

A concentração de TNF- $\alpha$  e IL-6 foi determinada nos fragmentos do duodeno, jejuno e íleo congelados no freezer à -80°C. Estes foram homogeneizados em solução tampão de PBS com anti – proteases, a amostra foi centrifugada por 10 min em 3000 rpm e o sobrenadante foi imediatamente coletado para dosagem de TNF- $\alpha$ . ou TNF- $\alpha$ . A detecção das concentrações dessa citocina foi realizada por ELISA espécie - específica, conforme orientação do fabricante (R&D system). Os resultados foram expressos em pg/ml a partir de uma curva padrão fornecida pelo fabricante.

#### ***5.6.6 Ensaio para Mieloperoxidase (MPO)***

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o trato gastrointestinal. Resumidamente, 50 a 100 mg dos segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foram colocados num tampão fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados em um macerador de tecidos (Politron<sup>®</sup>). A seguir, o homogenato foi centrifugado a 5000 rpm por 2 minutos. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita utilizando 0,0005% de peróxido de nitrogênio como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1mmol de peróxido de nitrogênio em água em 1 minuto (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

### 5.6.7 Análise Morfométrica e Histopatológica

Os segmentos obtidos de duodeno, jejuno e íleo foram fixados em formol a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura e fixados em hematoxilina e eosina. Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas as alturas de 10 vilos e as profundidades de 10 criptas de cada lâmina para cálculo da razão vilo/cripta. Em seguida, utilizando o sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer (1978) adaptado por Soares et al. (2008), um histopatologista que não conhecia os tratamentos realizados analisou todas as lâminas (Quadro 3).

**Quadro 3.** Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer adaptado por Soares et al. (2008)

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

Fonte. Soares et al. (2008).

### 5.7 Esvaziamento Gástrico e Trânsito Gastrintestinal na Mucosite Intestinal Induzida por 5-FU em camundongos

Para avaliar a motilidade do TGI será realizado a técnica de esvaziamento gástrico descrita por Reynell e Spray (1956), com adaptações. Inicialmente, camundongos (n= 6-8 por grupo) foram tratados com a dose única de 450 mg/kg de 5-FU (i.p.), exceto aqueles considerados controles negativos que receberam salina ou DMSO3% (450 mg/kg). . O

tratamento com probióticos aconteceu 1h, 24h e 48h após a indução de mucosite intestinal. Do 3º para o 4º dia experimental, foram mantidos em jejum de sólidos por 18 horas, mas com livre acesso a água até momentos antes do início do experimento. Após 72h da indução de mucosite por 5-FU, Cada animal recebeu, por gavagem, 300 µL da solução glicosada (5%) contendo vermelho de fenol (0,75 mg/ml), com um intervalo de 5 minutos de um animal para o outro. Após 20 minutos da administração do corante, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e submetidos a uma laparotomia mediana. Para tanto, foi aberto o abdômen por uma incisão mediana na parede abdominal desde o apêndice xifóide. Em seguida as junções esôfago-gástrica, gastroduodenal e íleo- cólica foram rapidamente isolados e o estômago e o intestino delgado foram retirados, estendidos e divididos em quatro segmentos consecutivos: Estômago, Intestino proximal (40%), medial (30%) e distal (30%). Com o auxílio de uma proveta contendo uma solução de NaOH (100ml, 0,1N) os volumes de cada segmentos foram determinados. Depois de medir o volume, os segmentos foram homogeneizados em uma solução de NaOH 0,1N com o auxílio de um macerador. Após a homogeneização foram retirados 1000 µL de cada amostra e centrifugados por 10 min a 2800 rpm. Foram retirados 500 µL do sobrenadante e a este adicionado ácido tricloroacético (TCA) (20% peso/volume) e centrifugado novamente por 20 min com a finalidade de obter a precipitação de proteínas. Por fim, uma placa de 96 poços foi montada com 150 µl da amostra e 200µl de NaOH (0,5 N), a placa foi lida numa leitora de ELISA sob um comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão foi obtida em cada experimento a partir de uma concentração conhecida de vermelho fenol após a adição da solução de NaOH (0,5 N). O coeficiente linear da curva padrão foi estabelecido e utilizado para determinação da concentração do corante da solução e em seguida foi calculada a quantidade de vermelho fenol recuperada em cada segmento.

A retenção gástrica do vermelho fenol foi expressa em porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula: Retenção gástrica= Quantidade de vermelho fenol recuperada do estômago/ Quantidade total de vermelho fenol recuperada em todos os quatro segmentos (estômago, intestino proximal, intestino medial e intestino distal). O trânsito intestinal foi estimado pela retenção fracional de VF em cada segmento intestinal

## **5.8 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (variáveis com distribuição normal) ou como mediana  $\pm$  mínimo e máximo (variáveis sem distribuição normal). A análise



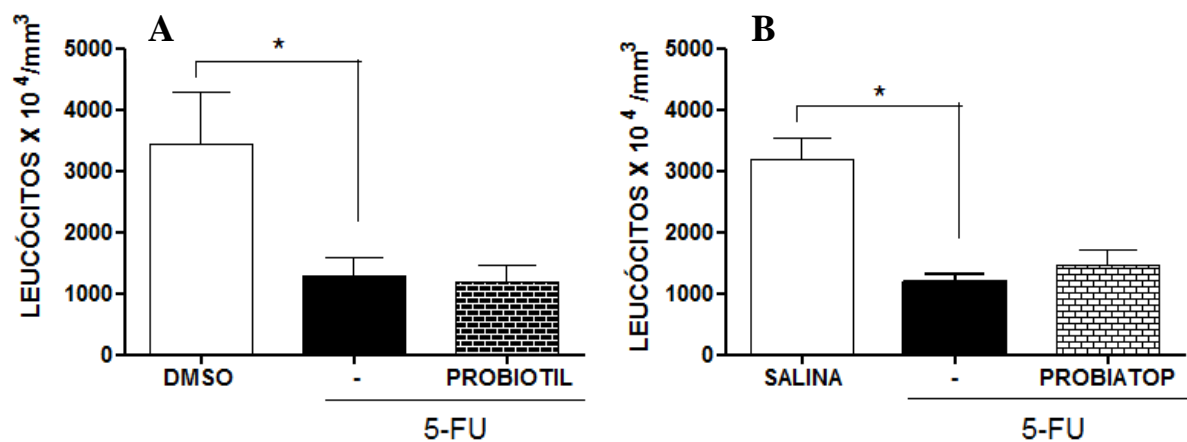
estatística foi feita usando o teste de análise de variância ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os escores histológicos serão avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns. Significância estatística foi observada para valores de  $p < 0,05$ . Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o software Prism versão 5 da GraphPad Software.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a contagem de leucócitos totais nos camundongos.

O tratamento com o 5-FU induziu uma significativa leucopenia nos animais (Figura 9- A  $1279 \pm 298,8$  células/mm<sup>3</sup>; B  $1200 \pm 120,5$  células/mm<sup>3</sup>) quando comparados aos controles salina (Figura 9-A  $3180 \pm 345,5$  células/mm<sup>3</sup>) ou DMSO3% (Figura 9-B  $3430 \pm 864,1$  células/mm<sup>3</sup>). Os tratamentos com o Probiotil<sup>®</sup> (Figura 9-A  $1180 \pm 270,8$  células/mm<sup>3</sup>) ou Probiatop<sup>®</sup> (Figura 9-B  $1471 \pm 243,9$  células/mm<sup>3</sup>) não reverteu significativamente a leucopenia induzida pelo quimioterápico (Figura 9-A e 8-B, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os dois probióticos.

**Figura 9.** Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> (A) ou Probiatop<sup>®</sup> (B) na leucopenia induzida pelo 5-FU.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

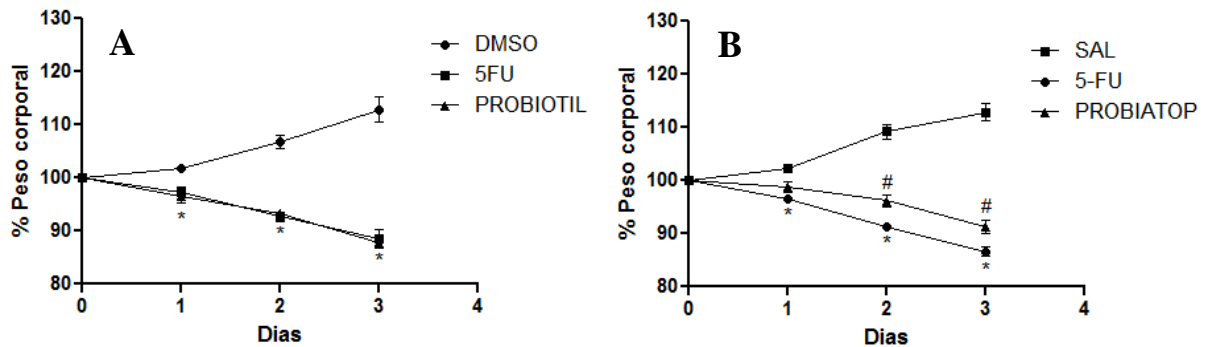
Os valores representam a média ± E.P.M. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle (DMSO (A) ou Salina (B)). Foi utilizado teste ANOVA seguido de Bonferroni.

### 6.2 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a análise ponderal nos camundongos.

O tratamento com 5-FU induziu uma perda de peso progressiva a partir do primeiro dia após a indução de mucosite intestinal (Figura 10- A – 1<sup>o</sup> dia 5,15%; 2<sup>o</sup> dia 12,67%; 3<sup>o</sup> dia 22,16%; Figura 10- B-1<sup>o</sup> dia 5,54%; 2<sup>o</sup> dia 16,43%; 3<sup>o</sup> dia 23,26%), comparado ao grupo controle. Conforme se observa na figura 10A, o pós-tratamento com Probiotil<sup>®</sup> não

foi capaz de reverter a perda de peso provocada pelo tratamento com 5-FU. No entanto, o pós-tratamento com Probiatop<sup>®</sup> reverteu a perda de peso induzida por 5-FU no 2º e 3º dia após o tratamento (Figura 10- B- 2º dia 11,93%; 3º dia 19,07%), em comparação ao 5-FU.

**Figura 10.** Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> (A) ou Probiatop<sup>®</sup> (B) na variação de peso corporal em comparação ao grupo 5-FU.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

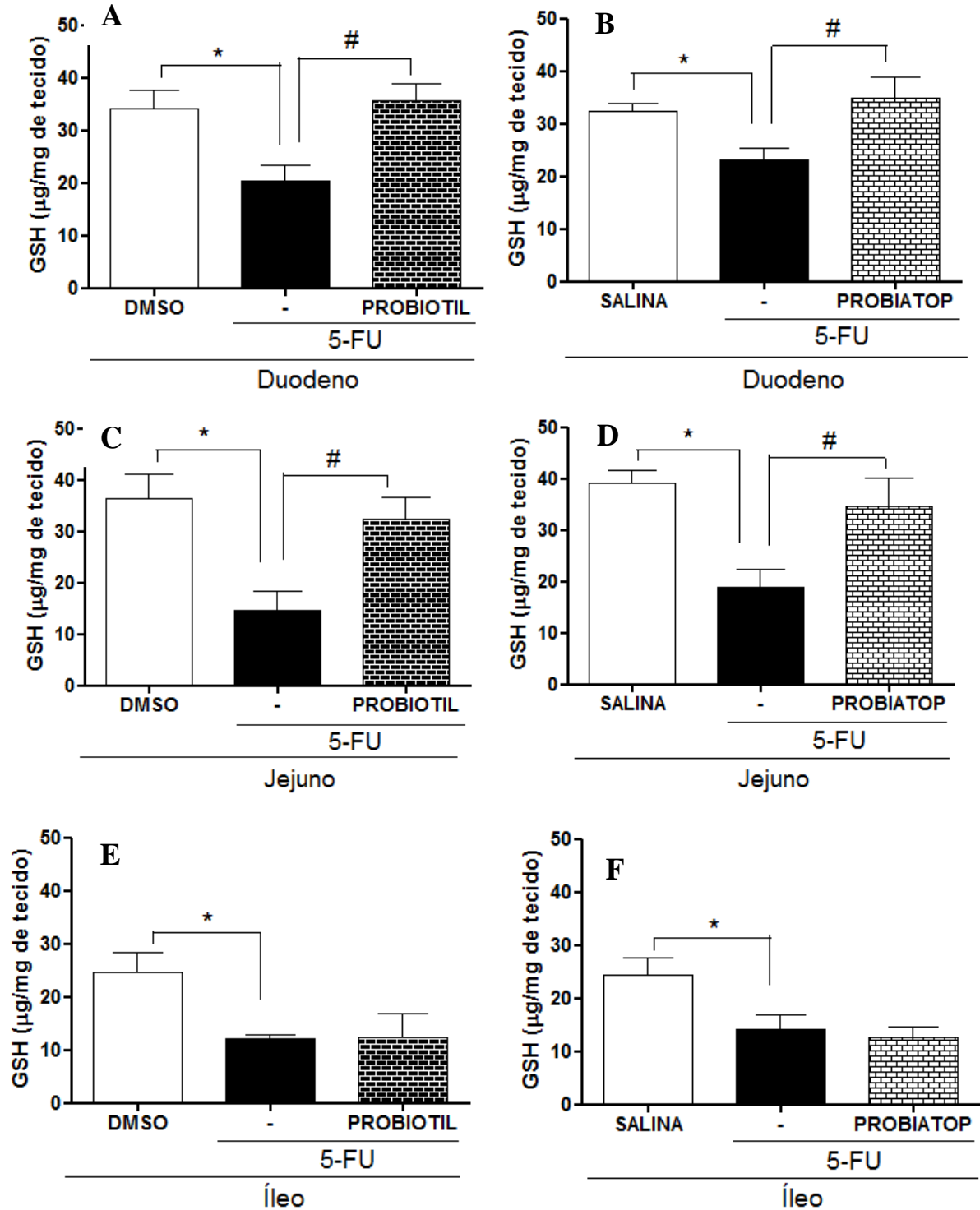
Todos os animais receberam dose única intraperitoneal de 5-FU (450mg/Kg), exceto os grupos controles (Salina ou DMSO). Os grupos Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> receberam os probióticos por três dias. Os animais foram pesados diariamente durante todo o experimento. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo controle (DMSO (A) ou Salina (B)), #  $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

### 6.3 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a concentração de GSH nos segmentos intestinais.

O tratamento com 5-FU induziu uma significativa redução da concentração de GSH no duodeno (Figura 11- A  $20,47 \pm 2,94 \mu\text{g/g}$  de tecido; B  $23,12 \pm 2,18 \mu\text{g/g}$  de tecido), jejuno (Figura 11- C  $14,71 \pm 3,55 \mu\text{g/g}$  de tecido; D  $18,89 \pm 3,54 \mu\text{g/g}$  de tecido) e no íleo (Figura 11- E  $12,16 \pm 0,68 \mu\text{g/g}$  de tecido; F  $14,14 \pm 2,61 \mu\text{g/g}$  de tecido), quando comparados aos respectivos controles (Figura 11- A  $34,21 \pm 3,40 \mu\text{g/g}$  de tecido; B  $32,35 \pm 1,43 \mu\text{g/g}$  de tecido; C  $36,31 \pm 4,80 \mu\text{g/g}$  de tecido; D  $39,14 \pm 2,54 \mu\text{g/g}$  de tecido; E  $24,53 \pm 3,81 \mu\text{g/g}$  de tecido; F  $24,36 \pm 3,14 \mu\text{g/g}$  de tecido).

O tratamento com ambos os probióticos reverteu o consumo de GSH no duodeno (Figura 11- A  $35,57 \pm 3,22 \mu\text{g/g}$  de tecido; B  $34,88 \pm 4,01 \mu\text{g/g}$  de tecido) e no jejuno (Figura 11- C  $32,41 \pm 4,31 \mu\text{g/g}$  de tecido; D  $34,62 \pm 5,41 \mu\text{g/g}$  de tecido), no entanto, no íleo essa reversão não foi observada (Figura 11- E  $12,48 \pm 4,29 \mu\text{g/g}$  de tecido; F  $12,65 \pm 1,85 \mu\text{g/g}$  de tecido).

**Figura 11.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,C,E) ou Probiatop® (B,D,F) na diminuição da concentração de GSH nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

Todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg) no primeiro dia, exceto os grupos controle (salina ou DMSO), e foram pós-tratados durante três dias com Probiotil® ou Probiatop®. Todos os animais foram eutanasiados no quarto dia do experimento. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para aferir a concentração de GSH. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo salina ou DMSO, # $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

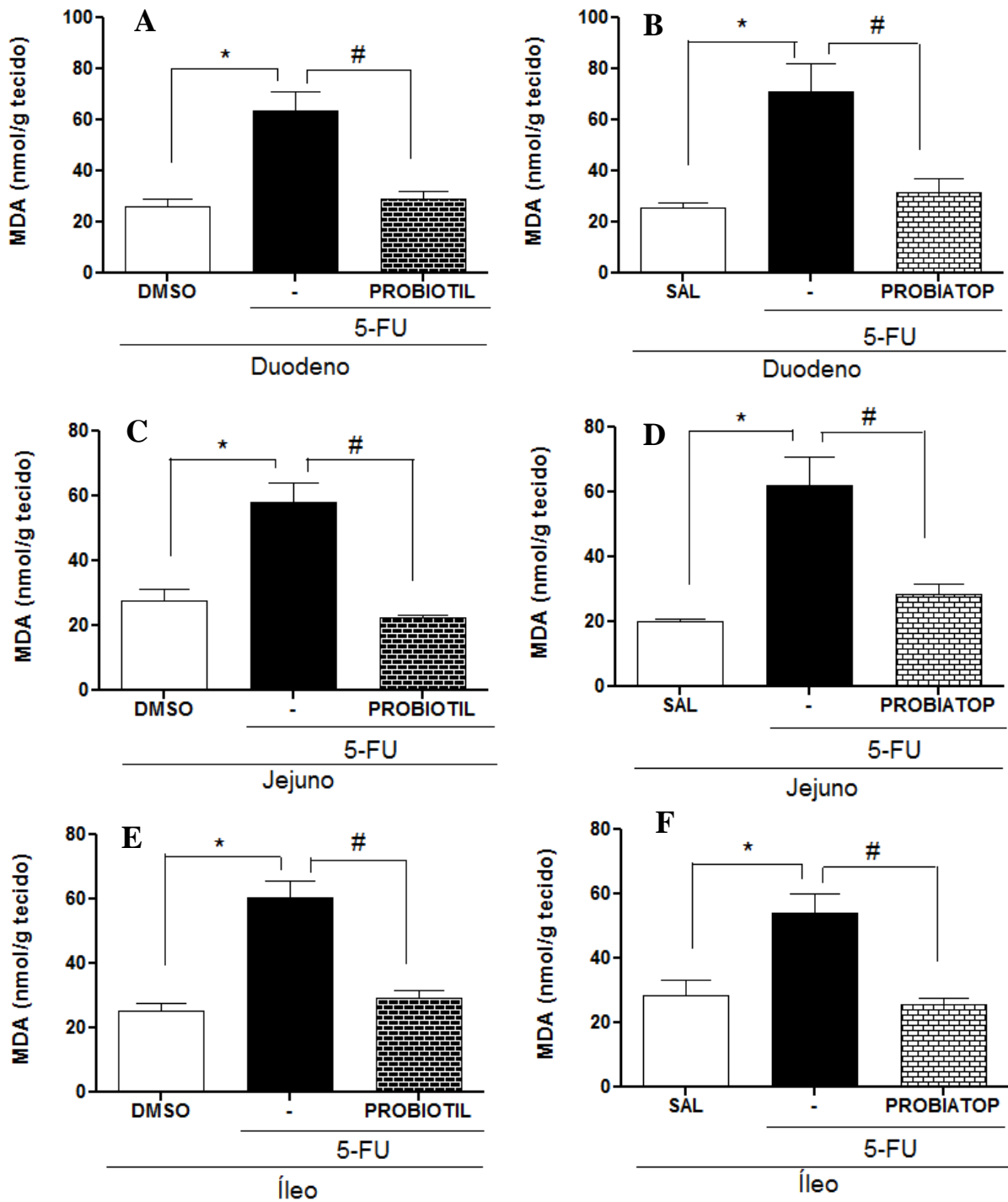
#### **6.4 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre os níveis de MDA nos segmentos intestinais.**

Na figura 12, observamos que o grupo de animais que receberam somente 5-FU, tiveram um aumento nos níveis de MDA nos três segmentos intestinais (Figura 12- duodeno: A  $63,51 \pm 7,40$  nmol/g de tecido; B  $71,19 \pm 10,71$  nmol/g de tecido; jejuno: C  $58,05 \pm 5,94$  nmol/g de tecido; D  $62,05 \pm 8,91$  nmol/g de tecido; íleo: E  $60,33 \pm 5,16$  nmol/g de tecido; F  $54,14 \pm 5,66$  nmol/g de tecido), quando comparados aos níveis dos respectivos grupos de animais controle (Figura 12- duodeno: A  $26,07 \pm 3,11$  nmol/g de tecido; B  $25,48 \pm 1,82$  nmol/g de tecido; jejuno: C  $27,67 \pm 3,52$  nmol/g de tecido; D  $20,0 \pm 0,80$  nmol/g de tecido; íleo: E  $25,38 \pm 2,28$  nmol/g de tecido; F  $28,33 \pm 4,77$  nmol/g de tecido).

O tratamento com Probiotil<sup>®</sup> reverteu o aumento dos níveis de MDA induzido pela administração de 5-FU tanto no duodeno (Figura 12- A  $28,81 \pm 2,96$  nmol/g de tecido), como no jejuno (Figura 12- C  $22,46 \pm 0,58$  nmol/g de tecido) e no íleo (Figura 12- E  $29,09 \pm 2,43$  nmol/g de tecido).

Essa reversão também foi observada no tratamento com Probiatop<sup>®</sup> no duodeno (Figura 12- B  $31,59 \pm 5,40$  nmol/g de tecido), no jejuno (Figura 12- D  $28,33 \pm 3,40$  nmol/g de tecido) e no íleo (Figura 12- F  $25,44 \pm 2,30$  nmol/g de tecido).

**Figura 12.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,C,E) ou Probiatop® (B,D,F) no aumento dos níveis de MDA nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

Todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg) no primeiro dia, exceto os grupos controle (salina ou DMSO), e foram pós-tratados durante três dias com Probiotil® ou Probiatop®. Todos os animais foram eutanasiados no quarto dia do experimento. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para aferir a concentração de MDA. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo salina ou DMSO, #  $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

### **6.5 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$ e IL-6, nos segmentos intestinais.**

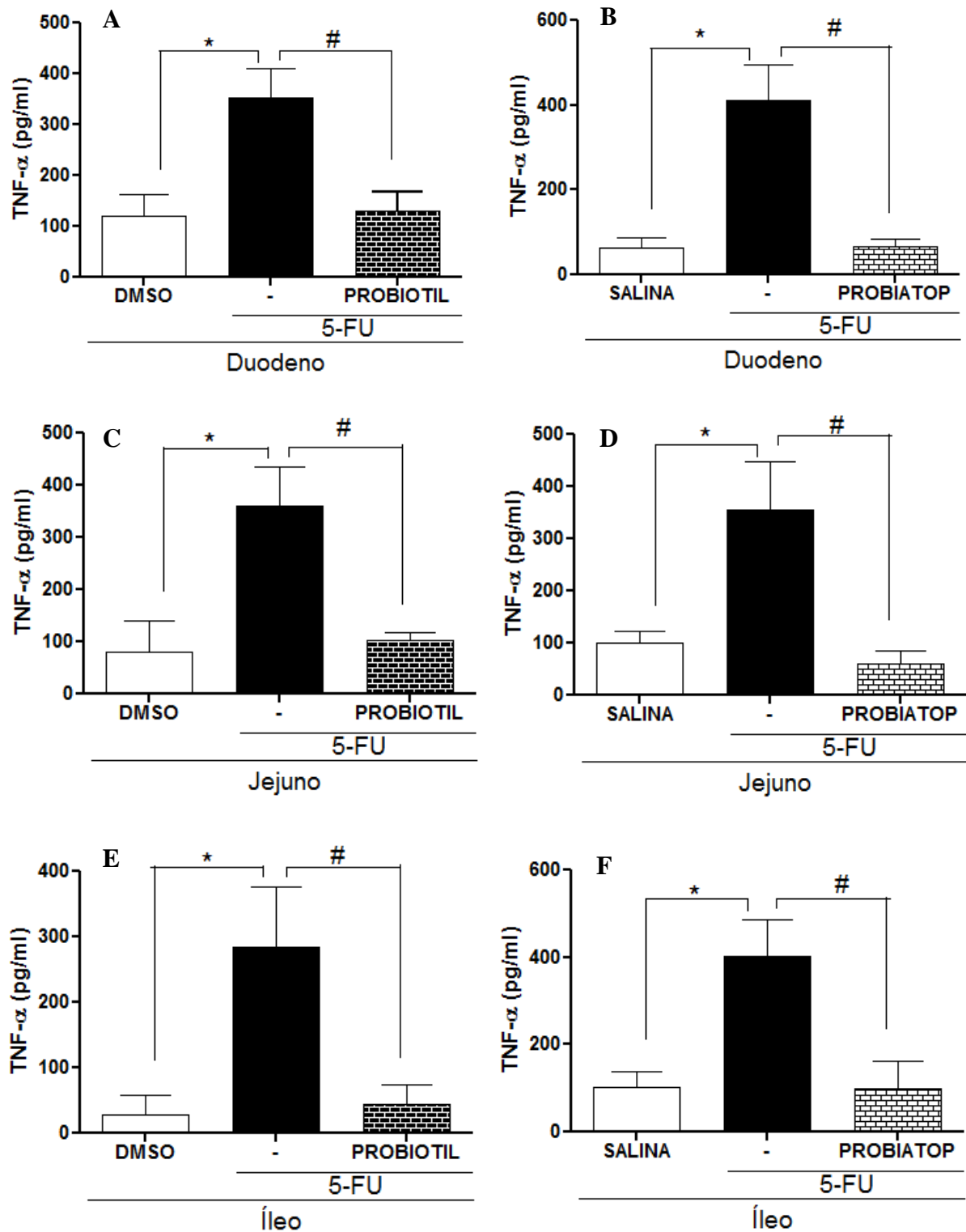
Na figura 13, observa-se um aumento da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  nos grupos tratados apenas com 5-FU nos três segmentos intestinais. No duodeno, o tratamento com 5-FU acarretou em um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  (Figura 13- A  $351,8 \pm 57,99$  pg/ml; B  $410,0 \pm 84,10$  pg/ml) quando comparados aos devidos controles (Figura 13- A  $121,1 \pm 41,03$  pg/ml; B  $61,89 \pm 24,60$  pg/ml). O pós-tratamento com os probióticos reverteu o aumento desta citocina no duodeno, atingindo valores bem próximos aos dos controles (Figura 13- A  $130,6 \pm 36,84$  pg/ml; B  $67,04 \pm 17,96$  pg/ml).

No jejuno, os níveis de TNF- $\alpha$  aumentaram nos animais tratados apenas com 5-FU (Figura 13- C  $360,4 \pm 75,47$  pg/ml; D  $355,1 \pm 91,39$  pg/ml) em relação aos controles (Figura 13- C  $80,50 \pm 59,66$  pg/ml; D  $100,9 \pm 21,32$  pg/ml), foi observado a reversão deste aumento nos animais tratados com os probióticos (Figura 13- C  $101,6 \pm 15,23$  pg/ml; D  $60,07 \pm 25,57$  pg/ml).

No íleo os níveis de TNF- $\alpha$  também aumentaram significativamente em decorrência do tratamento com 5-FU (Figura 13- E  $401,0 \pm 86,16$  pg/ml; F  $284,6 \pm 90,44$  pg/ml) quando comparados aos animais não induzidos com 5-FU (Figura 13- E  $103,4 \pm 33,91$  pg/ml; F  $27,89 \pm 31,07$  pg/ml). Tanto Probiotil<sup>®</sup> como o Probiatop<sup>®</sup> reverteram o aumento desta citocina no íleo (Figura 13- E  $98,71 \pm 62,80$  pg/ml; F  $43,55 \pm 30,95$  pg/ml, respectivamente).

A outra citocina pró-inflamatória avaliada foi a IL-6, que assim como o TNF- $\alpha$  se mostrou elevada nos três segmentos intestinais nos grupos tratados somente com 5-FU (Figura 14- A  $28,38 \pm 5,62$  pg/ml; B  $48,24 \pm 11,67$  pg/ml; C  $27,68 \pm 7,38$  pg/ml; D  $33,09 \pm 8,26$  pg/ml; E  $35,35 \pm 4,93$  pg/ml; F  $48,49 \pm 11,77$  pg/ml) em comparação aos respectivos controles (Figura 14- A  $8,52 \pm 3,94$  pg/ml; B  $10,55 \pm 3,90$  pg/ml; C  $8,09 \pm 0,72$  pg/ml; D  $5,96 \pm 2,50$  pg/ml; E  $10,55 \pm 3,28$  pg/ml; F  $10,80 \pm 2,62$  pg/ml). O tratamento com Probiotil<sup>®</sup> como com o Probiatop<sup>®</sup> reverteu o aumento de IL-6 induzido pelo quimioterápico nos três segmentos intestinais (Figura 14- A  $7,39 \pm 2,39$  pg/ml; B  $4,81 \pm 1,28$  pg/ml; C  $7,11 \pm 2,48$  pg/ml; D  $4,39 \pm 1,56$  pg/ml; E  $8,45 \pm 3,14$  pg/ml; F  $8,98 \pm 4,47$  pg/ml).

**Figura 13.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,C,E) ou Probiatop® (B,D,F) no aumento da expressão de TNF- $\alpha$  nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.

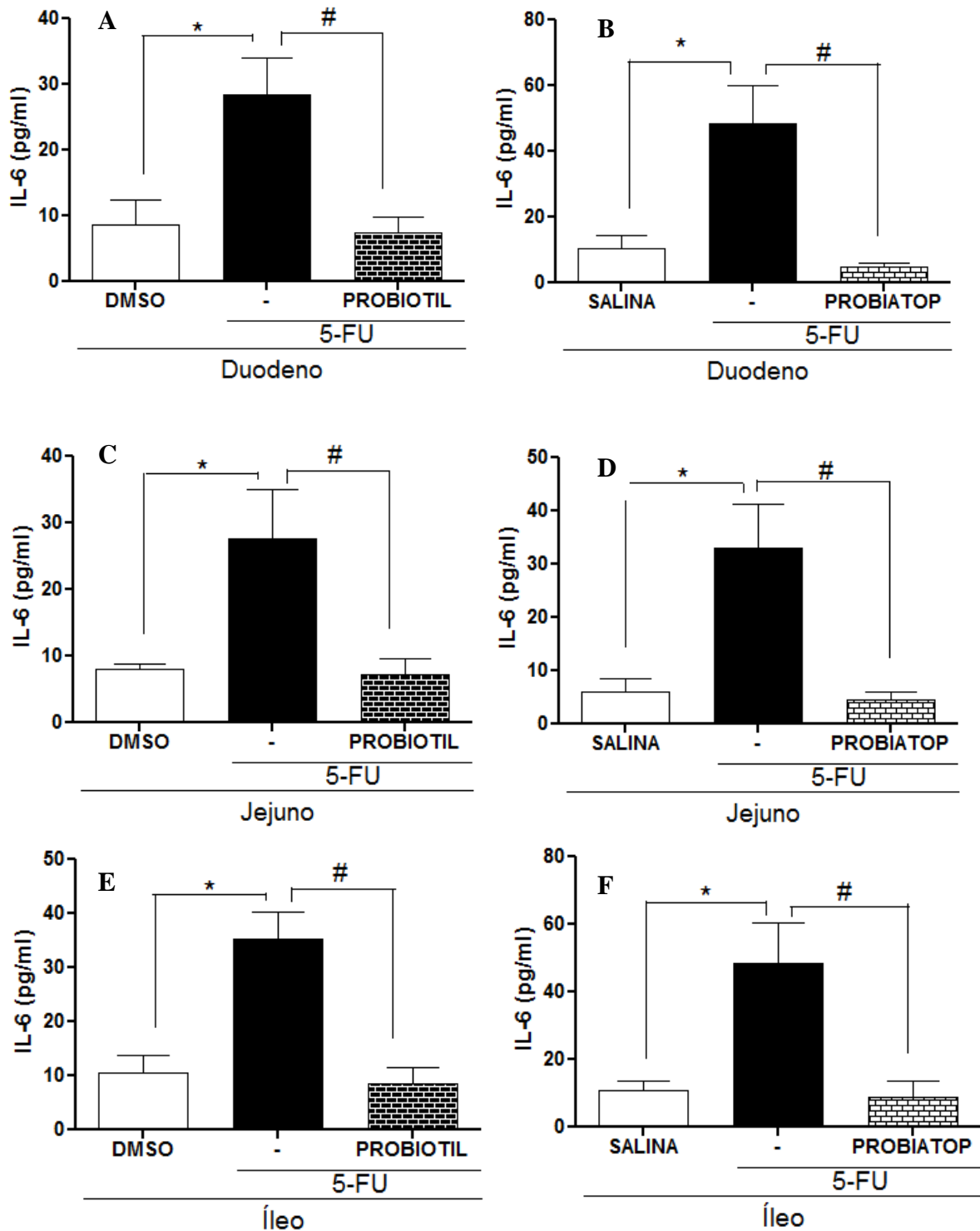


**Fonte.** Elaborado pela autora.

Todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg) no primeiro dia, exceto os grupos controle (salina ou DMSO), e foram pós-tratados durante três dias com Probiotil® ou Probiatop®. Todos os animais foram eutanasiados no quarto dia do experimento. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para aferir a concentração de TNF- $\alpha$ . Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo salina ou DMSO, #  $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.



**Figura 14.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,C,E) ou Probiatop® (B,D,F) no aumento da expressão de IL-6 nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

Todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg) no primeiro dia, exceto os grupos controle (salina ou DMSO), e foram pós-tratados durante três dias com Probiotil® ou Probiatop®. Todos os animais foram eutanasiados no quarto dia do experimento. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para aferir a concentração de IL-6. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo salina ou DMSO, #  $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

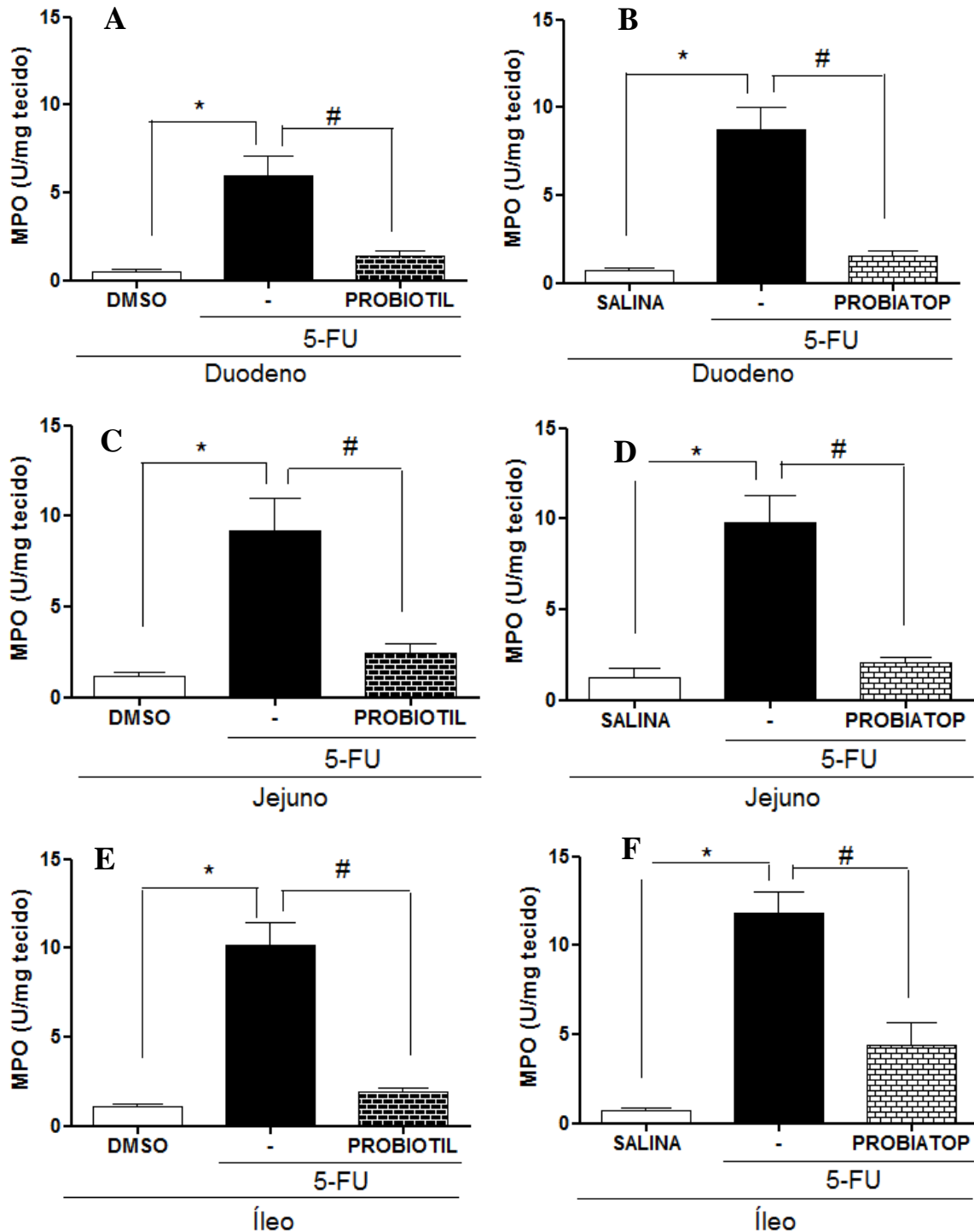
## 6.6 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> sobre a atividade de MPO nos segmentos intestinais.

Nos animais tratados com 5-FU foi encontrado um importante aumento do infiltrado neutrofílico nos três segmentos intestinais. Observa-se um aumento na atividade de MPO do duodeno (Figura 15- A  $5,96 \pm 1,15$  UMPO/mg tecido; B  $8,76 \pm 1,25$  UMPO/mg tecido), no jejuno (Figura 15- C  $1,12 \pm 0,28$  UMPO/mg tecido; D  $1,20 \pm 0,58$  UMPO/mg tecido) e no íleo (Figura 15- E  $1,07 \pm 0,17$  UMPO/mg tecido; F  $0,74 \pm 0,12$  UMPO/mg tecido) quando comparado aos respectivos controles (Figura 15- A  $0,49 \pm 0,11$  UMPO/mg tecido; B  $0,68 \pm 0,16$  UMPO/mg tecido; C  $1,12 \pm 0,28$  UMPO/mg tecido; D  $1,20 \pm 0,58$  UMPO/mg tecido; E  $1,07 \pm 0,17$  UMPO/mg tecido; F  $0,74 \pm 0,12$  UMPO/mg tecido).

O tratamento com Probiotil<sup>®</sup> foi capaz de reverter o aumento da atividade de MPO no duodeno (Figura 15- A  $1,37 \pm 0,30$  UMPO/mg tecido), jejuno (Figura 15- C  $2,44 \pm 0,51$  UMPO/mg tecido) e também no íleo (Figura 15- E  $1,89 \pm 0,21$  UMPO/mg tecido), quando comparados aos animais que receberam somente 5-FU.

O Probiatop<sup>®</sup> se comportou de forma semelhante ao Probiotil<sup>®</sup>, revertendo o aumento da MPO induzida por 5-FU no duodeno (Figura 15- B  $1,53 \pm 0,30$  UMPO/mg tecido), jejuno (Figura 15- D  $2,08 \pm 0,24$  UMPO/mg tecido) e íleo (Figura 15- F  $4,39 \pm 1,27$  UMPO/mg tecido).

**Figura 15.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,C,E) ou Probiatop® (B,D,F) no aumento da atividade de MPO nos segmentos intestinais induzidos por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

Todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg) no primeiro dia, exceto os grupos controle (salina ou DMSO), e foram pós-tratados durante três dias com Probiatop® ou Probiotil®. Todos os animais foram eutanasiados no quarto dia do experimento. Segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram obtidos para a realização do ensaio da atividade de MPO. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  comparado com o grupo salina ou DMSO, #  $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

### 6.7 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> na análise histopatológica dos segmentos intestinais.

Em relação aos escores histopatológicos foi evidenciado que os animais do grupo controle (salina ou DMSO) apresentaram mucosa e camada muscular normais no duodeno, jejuno e íleo. Os grupos que receberam somente 5-FU apresentaram no duodeno e jejuno as seguintes características: mucosa com vilos encurtados com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema mas camada muscular normal. No íleo, além das alterações na mucosa, observou-se alterações na camada muscular com presença de edema, vacuolização e infiltrado neutrofílico. Com base nestes achados, os escores histológicos nos grupos tratados somente com 5-FU foram maiores que os do controle (Salina ou DMSO). Os grupos que receberam Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> não reverteram significativamente o aumento dos escores histológicos induzidos por 5-FU, com exceção do jejuno do grupo tratado com Probiatop<sup>®</sup> em relação ao grupo 5-FU (Tabela 2 e 3, respectivamente). Nas fotomicrografias observam-se as alterações relatadas (Figura 16; Figura 17; Figura 18).

**Tabela 2.** Escores histopatológicos nos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com Probiotil<sup>®</sup>.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle (DMSO)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
5-FU+DMSO	2*(0-3)	2*(1-3)	3*(1-3)
5-FU+Probiotil <sup>®</sup>	1 (0-3)	1,5(1-3)	2 (1-3)

**Fonte.** Elaborado pela autora.

Os valores representam a mediana seguido de valores mínimo e máximo. \*p<0,05 quando comparado ao grupo DMSO.. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns..

**Tabela 3.** Escores histopatológicos nos segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com Probiatop<sup>®</sup>.

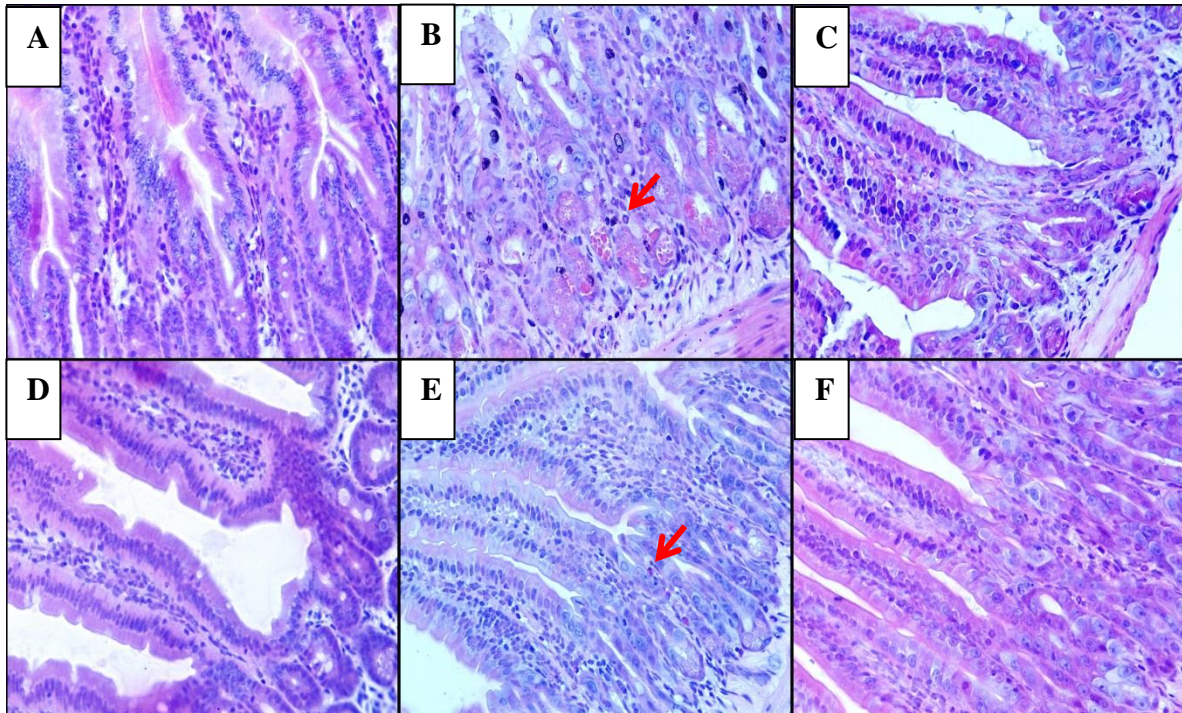
GRUPOS EXPERIMENTAIS	ESCORES		
	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
Controle (Salina)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
5-FU+Salina	1*(0-2)	2*(1-3)	3*(2-3)
5-FU+Probiatop <sup>®</sup>	0 (0-2)	1 <sup>#</sup> (1-2)	2 (2-3)

**Fonte.** Elaborado pela autora.

Os valores representam a mediana seguido de valores mínimo e máximo. \*p<0,05 quando comparado ao grupo Salina e # p<0,05 quando comparado ao grupo 5- FU + Salina. Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunns..



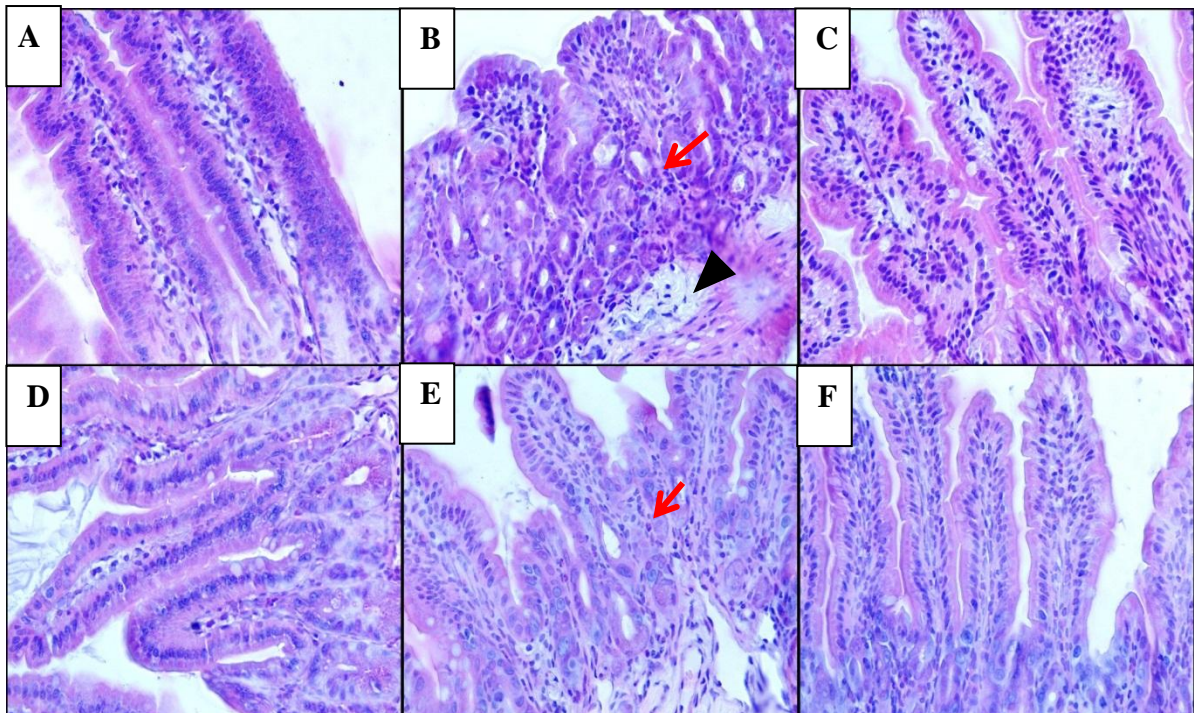
**Figura 16.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,B, C) ou Probiatop® (D, E, F) sobre as alterações histopatológicas no duodeno induzidas por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

Fotomicrografias (aumento de 400X) do duodeno de camundongos tratados com DMSO (A) ou salina (D), 5-FU+DMSO (B) ou 5-FU+salina (E) e 5-FU+Probiotil® (C) ou 5-FU+Probiatop® (F). A seta vermelha indica presença de infiltrado neutrofílico.

**Figura 17.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,B, C) ou Probiatop® (D, E, F) sobre as alterações histopatológicas no jejunum induzidas por 5-FU em camundongos.

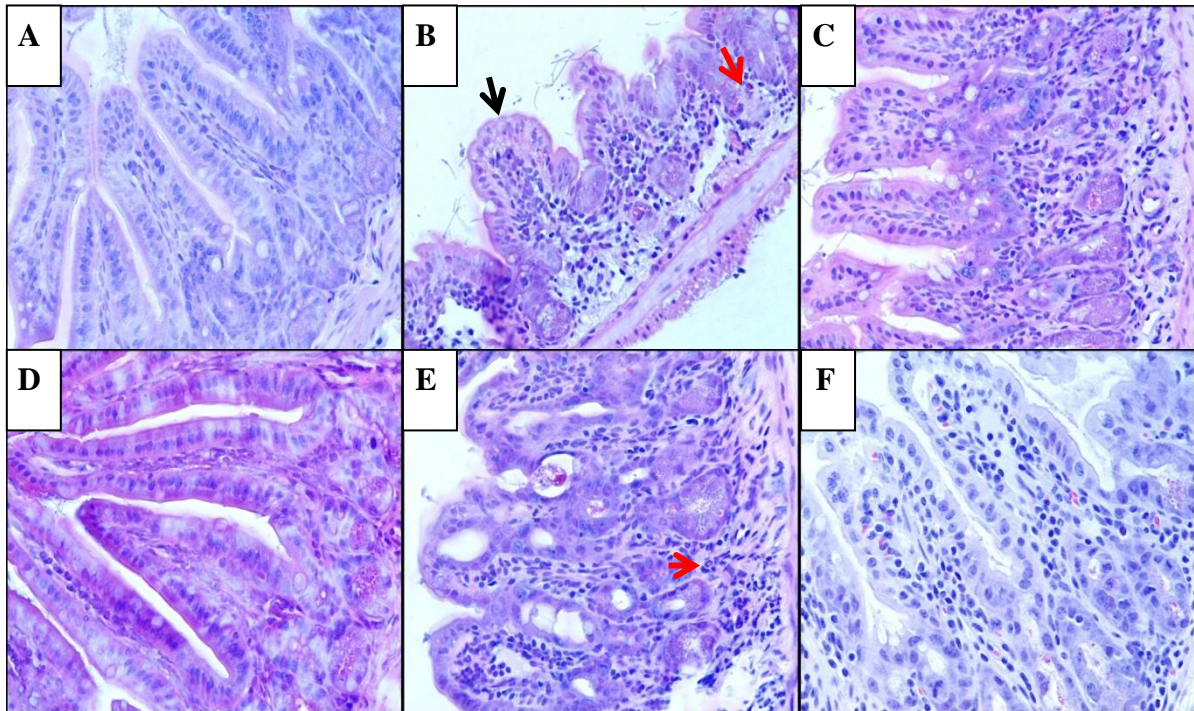


**Fonte.** Elaborado pela autora.

Fotomicrografias (aumento de 400X) do duodeno de camundongos tratados com DMSO (A) ou salina (D), 5-FU+DMSO (B) ou 5-FU+salina (E) e 5-FU+Probiotil® (C) ou 5-FU+Probiatop® (F). A seta vermelha indica presença de infiltrado neutrofílico. A seta vermelha indica presença de infiltrado neutrofílico e a cabeça de seta preta indica presença de edema.



**Figura 18.** Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> (A, B, C) ou Probiatop<sup>®</sup> (D, E, F) sobre as alterações histopatológicas no íleo induzidas por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

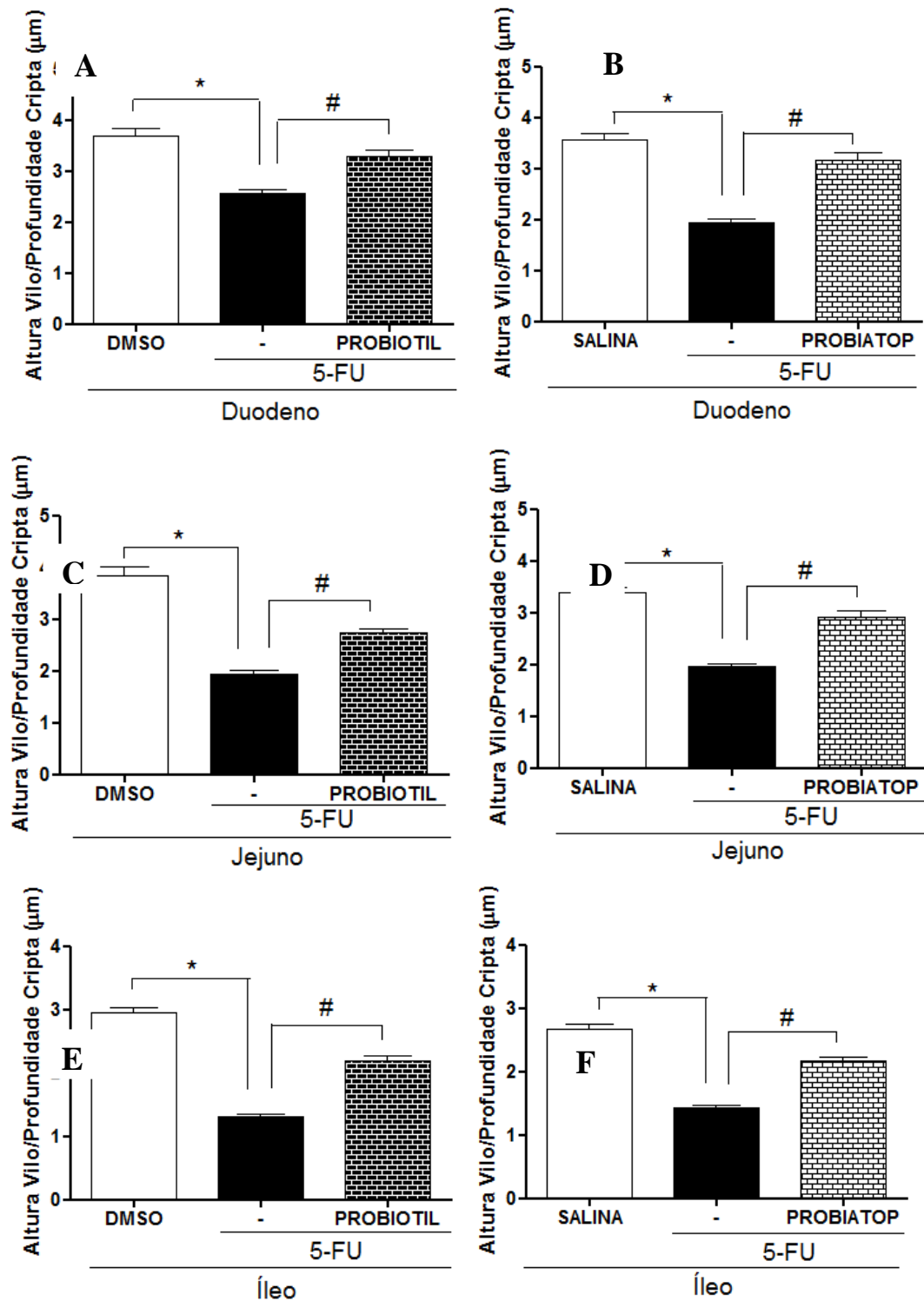
Fotomicrografias (aumento de 400X) do íleo de camundongos tratados com DMSO (A) ou salina (D), 5-FU+DMSO (B) ou 5-FU+salina (E) e 5-FU+Probiotil<sup>®</sup> (C) ou 5-FU+Probiatop<sup>®</sup> (F). A seta vermelha indica presença de infiltrado neutrofilico. A seta vermelha indica presença de infiltrado neutrofilico e a seta preta indica vacuolização.

### 6.8 Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> sobre a análise morfométrica (relação vilo/cripta) nos segmentos intestinais.

O tratamento com 5-FU induziu uma significativa diminuição na altura dos vilos, bem como, um aumento na profundidade das criptas, ocasionando uma diminuição na razão vilo/cripta nos três segmentos intestinais (duodeno: Figura 19- A  $2,56 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ; B  $1,94 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ; jejuno: Figura 19- C  $1,93 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ; D  $1,96 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ; íleo: Figura 19- E  $1,30 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ; F  $1,43 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ) quando comparados aos respectivos controles (Figura 19- A  $3,68 \pm 0,15 \mu\text{m}$ ; B  $3,57 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ; C  $3,83 \pm 0,16 \mu\text{m}$ ; D  $3,39 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ; E  $2,95 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ; F  $2,67 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ).

O tratamento com probióticos protegeu a mucosa epitelial do dano provocado pelo tratamento com 5-FU, restaurando a razão vilo/cripta. O tratamento com Probiotil<sup>®</sup> reestabeleceu a relação vilo/cripta no duodeno (Figura 19- A  $3,29 \pm 0,10 \mu\text{m}$ ), jejuno (Figura 19- C  $2,73 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ) e íleo (Figura 19- E  $2,18 \pm 0,08 \mu\text{m}$ ). Resultados semelhantes foram observados no tratamento com Probiatop<sup>®</sup> no duodeno (Figura 19- B  $3,17 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ), jejuno (Figura 19- C  $2,91 \pm 0,12 \mu\text{m}$ ) e no íleo (Figura 19- F  $2,16 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ).

**Figura 19.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,C,E) e Probiatop® (B,D,F) sobre a redução da razão vilosidade/cripta induzida por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

Todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg), com exceção dos controles (Salina e DMSO), os animais dos grupos probióticos foram tratados com o respectivo probiótico por três dias (2,5 ml/dia). Todos os animais foram sacrificados no quarto dia do experimento. Segmentos do duodeno (A e B), jejuno (C e D) e íleo (E e F) foram obtidos para análise da altura dos vilos e profundidade das criptas para obtenção da razão altura vilosidade/profundidade cripta. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. \*p<0,05

comparado com o grupo salina ou DMSO, #  $p < 0,05$  comparados com o grupo 5-FU pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

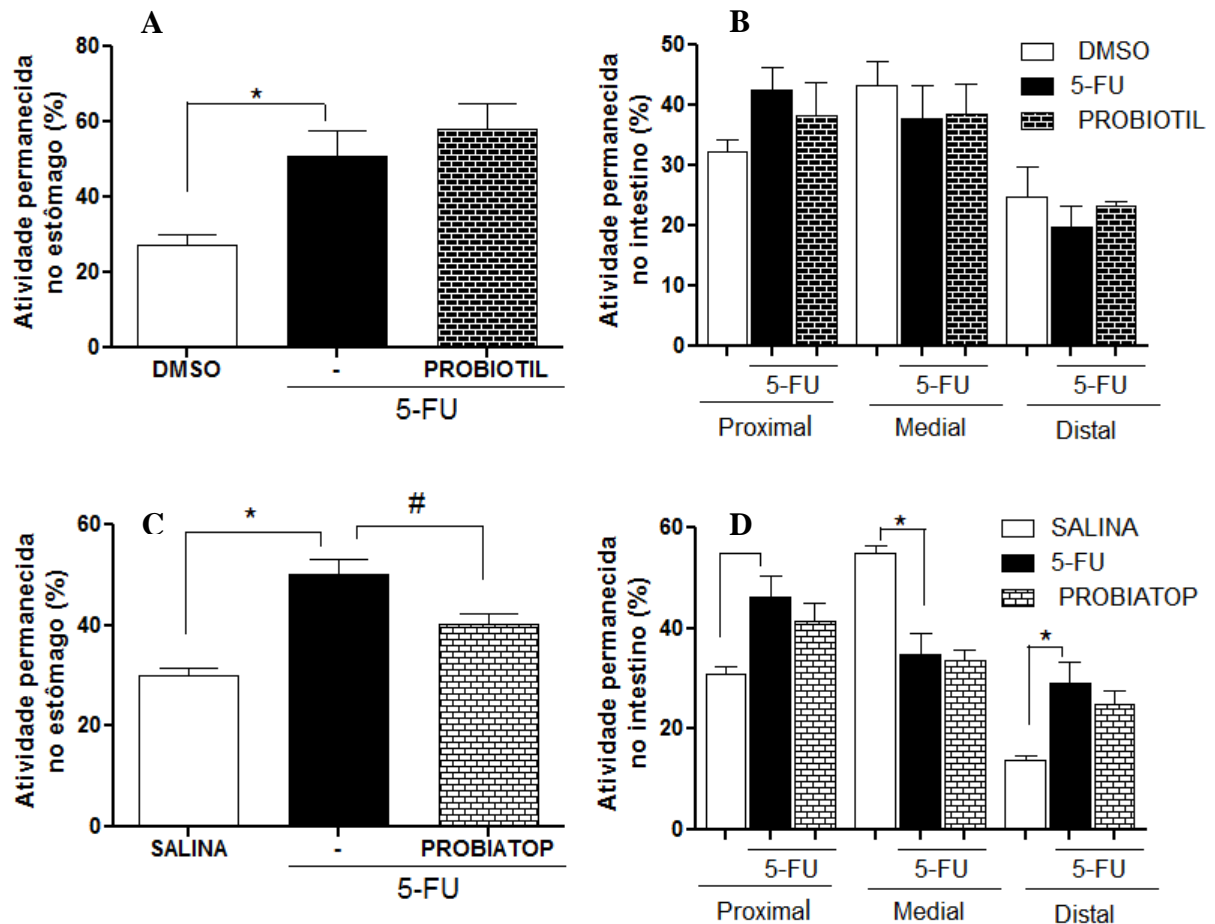
### **6.9. Efeito do tratamento com Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> sobre o esvaziamento gástrico e trânsito gastrointestinal nos camundongos.**

O tratamento com Probiotil<sup>®</sup> não reverteu o retardo do esvaziamento gástrico e do trânsito intestinal induzido pelo tratamento com 5-FU no modelo de mucosite intestinal em camundongos. Observa-se na figura 20A que o 5-FU induziu um significativo aumento na retenção gástrica (Figura 20- A  $50,99 \pm 6,46\%$ ) quando comparado ao controle DMSO (Figura 20- A  $27,36 \pm 2,65\%$ ), no entanto essa alteração não foi revertida pelo tratamento com Probiotil<sup>®</sup> (Figura 20- A  $58,04 \pm 6,71\%$ ). Quanto ao trânsito intestinal, observa-se na figura 20B que apesar de haver uma tendência a uma maior retenção intestinal pelos grupos tratados com 5-FU (Figura 20- B proximal  $42,38 \pm 3,80\%$ ; medial  $37,77 \pm 5,43\%$  e distal  $19,85 \pm 3,42\%$ ), não há uma diferença significativa entre o grupo induzido (5-FU) e o grupo controle DMSO (Figura 20-B proximal  $32,19 \pm 2,08\%$ ; medial  $43,13 \pm 4,19\%$ ; distal  $24,66 \pm 5,07\%$ , proximal, medial e distal, respectivamente). O tratamento com Probiotil<sup>®</sup> não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo 5-FU, no entanto, observa-se uma tendência a uma melhoria do retardo do trânsito intestinal (Figura 20-B P  $38,26 \pm 5,57\%$ ; M  $38,44 \pm 5,07\%$ ; D  $23,30 \pm 0,71\%$ ).

Na figura 20C, observa-se que, o 5-FU induziu um significativo aumento na retenção gástrica (Figura 20- C  $50,13 \pm 3,10\%$ ), quando comparado com o controle (salina) (Figura 20- C  $30,0 \pm 1,46\%$ ), este retardo do esvaziamento gástrico foi revertido com o tratamento com Probiatop<sup>®</sup> (Figura 20- C  $42,11 \pm 2,41\%$ ), no entanto, não foi capaz de melhorar o retardo do trânsito gastrointestinal (Figura 20-D), que apresentou aumento da retenção no segmento proximal (Figura 20- D  $46,11 \pm 4,28\%$ ), diminuição no segmento medial (Figura 20- D  $34,80 \pm 4,09\%$ ) e distal (Figura 17- D  $29,07 \pm 4,33\%$ ) nos grupos tratados com 5-FU, quando comparado ao grupo salina (Figura 20- D proximal  $30,87 \pm 1,42\%$ ; medial  $54,81 \pm 1,45\%$ ; distal  $13,89 \pm 0,80\%$ , respectivamente), o pós-tratamento com Probiatop<sup>®</sup> não reverteu as alterações do trânsito gastrointestinal induzidas pelo 5-FU.



**Figura 20.** Efeito do tratamento com Probiotil® (A,B) e Probiatop® (C,D) sobre as alterações na atividade permanecida no estômago e intestino induzido por 5-FU em camundongos.



**Fonte.** Elaborado pela autora.

Todos os animais receberam dose única, intraperitoneal, de 5-FU (450mg/Kg) no primeiro dia, exceto os grupos controle (DMSO ou Salina), e foram pós-tratados durante três dias com o respectivo probiótico. Do segundo para o terceiro dia todos os animais ficaram em jejum de 18h. No dia do experimento, os animais receberam por gavagem de 0,3 ml a solução glicosada (5%) contendo vermelho de fenol a 0,75 mg/ml. Os resultados mostram a quantidade de vermelho fenol recuperada no estômago (Figura 20 A, C) e intestino (Figura 20 B, D), 20 min depois da gavagem. Os valores foram expressos como porcentagem da atividade total no trato gastrointestinal. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina ou DMSO, pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos que os probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) reverteram as alterações inflamatórias, morfométricas e o estresse oxidativo no modelo de mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil em camundongos, sem alterar a leucopenia. O mecanismo pela qual esses compostos desenvolvem suas funções incluía redução dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6, diminuição do infiltrado neutrofílico (atividade de MPO), prevenção do consumo de glutathiona reduzida (GSH), redução dos níveis de malondialdeído (MDA), e assim preservando a integridade da mucosa intestinal. Além disso, nossos dados demonstraram que os probióticos não foram capazes de reverter as alterações motoras (transito gastrintestinal) promovidas pela administração de 5-FU, exceto o tratamento com Probiatop<sup>®</sup> que reverteu o retardo do esvaziamento gástrico.

O 5-FU exerce seus efeitos terapêuticos por meio de ação citotóxica sobre as células cancerígenas, e dessa forma impedindo a proliferação celular e induzindo apoptose (LONGLEY, HARKIN; JOHNSTON, 2003; SAVVA-BORDALO et al., 2010). No entanto, devido sua inespecificidade, pode também atuar sobre as células normais, afetando principalmente tecidos de rápida proliferação celular, incluindo a medula óssea, o qual promove intensa leucopenia em pacientes sob tratamento (ANDRADE; SILVA, 2007). Em consonância com resultados clínicos, nossos resultados no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU, demonstram importante efeito colateral deste fármaco, demonstraram que a administração deste quimioterápico promoveu intensa leucopenia, e que ambos os probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) não apresentaram qualquer efeito sobre este parâmetro. De forma semelhante, Justino (2011) ao utilizar o probiótico *Saccharomyces boulardii* também não observou efeito sobre este parâmetro no mesmo modelo experimental. Embora a leucopenia seja prejudicial ao paciente em tratamento com quimioterápico ao promover baixa na imunidade (BONASSA, 2005), o fato dos probióticos não exercerem efeitos sobre este parâmetro é importante e pode sugerir uma possível ausência de interferência sobre o efeito citotóxico desencadeado pela ação do 5-FU, de modo a não comprometer a eficácia terapêutica do antineoplásico.

Outro aspecto clínico de suma importância na quimioterapia com 5-FU é a perda acentuada de peso corporal, o qual pode ser resultante da disbiose intestinal promovida pelo tratamento (MARTINS et al., 2009; MELO et al., 2002). Nestas condições, bactérias benéficas da microbiota endógena que formam uma barreira contra os microrganismos

invasores, permanecem em menores proporções com a agressividade do tratamento, e assim expõe o epitélio intestinal aos efeitos colaterais induzidos pela administração do 5-FU (ALMEIDA et al., 2009). Shinya (2010) relata que as “bactérias boas” como os lactobacilos, têm como principal função a síntese de enzimas antioxidantes essenciais para a neutralização de radicais livres produzidos no intestino. Esses radicais livres quando não são neutralizados pela carência desses lactobacilos ou por quaisquer outras razões, induzem uma resposta inflamatória nas vilosidades da mucosa, comprometendo as regiões absortivas intestinais (RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2008).

Neste estudo, foi observado ainda que a administração de 5-FU promoveu intensa perda de peso corporal e que o tratamento com Probiatop<sup>®</sup> mas não com Probiotil<sup>®</sup> preveniu esta alteração. O fato de apenas o Probiatop<sup>®</sup> prevenir a perda de peso induzida pelo 5-FU pode estar relacionado a propriedades atribuídas às duas espécies adicionais (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*), comparado ao Probiotil<sup>®</sup>. Neste sentido, tem sido demonstrado que essas espécies adicionais regulam o processo inflamatório por modular a produção/ação de interleucina-10 (IL-10), uma importante reguladora da inflamação decorrente de disbiose intestinal (RAKOFF-NAHOUM; MEDZHITOV, 2008). Assim, nossos resultados sugerem que a composição adicional do Probiatop<sup>®</sup> apresenta um efeito modulador da microbiota intestinal adicional em relação ao Probiotil<sup>®</sup>.

Estudos clínicos tem demonstrado que pacientes sob tratamento com quimioterápicos apresentam produtos da peroxidação lipídica aumentados, associados a uma redução da capacidade antioxidante após o tratamento quimioterápico (FABER et al, 1995; FAURE et al, 1996; WEIJL, 1998). Esses eventos foram bem caracterizados por Sonis (2004) em modelos experimentais de mucosite induzida por quimioterápicos. O dano à mucosa intestinal inicia-se logo após a exposição à quimioterapia, com indução da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que contribui para a ativação de uma cascata de eventos biológicos desencadeando o processo inflamatório (SONIS, 2004). Desta forma, a presença de estresse oxidativo é de suma importância para desenvolvimento da mucosite intestinal e sua avaliação pode ser associada com o índice de dano ao epitélio. Neste sentido, a glutathiona reduzida (GSH), um importante antioxidante endógeno, protege as células por meio da conjugação e conseqüentemente a remoção de metabólitos reativos produzidos durante a peroxidação lipídica, dessa forma a redução dos níveis basais de GSH indica a presença de intenso estresse oxidativo (MEISTER, 1974).

Nossos resultados demonstraram que a administração de 5-FU promoveu um aumento do consumo de GSH nos três segmentos intestinais avaliados (duodeno, jejuno e

íleo). Por outro lado, o tratamento com ambos os probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) preveniu esse consumo no duodeno e jejuno, mas não no íleo. Um fator que pode estar associado a esta discrepância é a heterogeneidade de distribuição da microbiota intestinal ao longo do intestino delgado (TRABULSI; SAMPAIO, 2004). Tem sido demonstrado que o íleo é o sítio mais colonizado por microrganismos residentes, e que sofre o maior impacto decorrente da alteração da microbiota intestinal induzida pelo tratamento com 5-FU (MACDONALD, 1997). Essa disbiose está relacionada a um maior aumento de estresse oxidativo (POVOA, 2005), implicando no consumo dos mecanismos de defesa antioxidantes. Juntos, esses aspectos podem explicar o fato de que no presente estudo os probióticos não tenham sido capazes de reestabelecer os níveis de GSH nesta porção intestinal.

O aumento de produtos da peroxidação lipídica é reflexo do dano oxidativo promovido pelo estresse oxidativo aos lipídeos de membrana celulares, deste modo, o malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, é um importante marcador deste parâmetro (BETTERIDGE, 2000; SUN et al., 2000; MIYAZONO; GAO; HORIE, 2004; FUCHS-TARLOVSKY, 2013). No presente estudo, observou-se que o tratamento com 5-FU aumentou os níveis de MDA nos três segmentos intestinais analisados, e que ambos os probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) foram capazes de reverter esta alteração, corroborando com a prevenção do consumo de GSH. O efeito de probióticos na regulação de parâmetros oxidativo já tem sido bem demonstrado na literatura em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Justino et al. (2014; 2015) demonstrou que *S. boulardii* e *L. acidophilus* apresentaram a capacidade de prevenir o consumo de GSH em modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Além disso, foi demonstrado em estudos *in vitro* que diferentes cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, e *Lactobacillus rhamnosus*) (KULLISAAR et al., 2002; XING et al., 2015) e *Bifidobacterium longum* (AMANATIDOU et al., 2001) reagem através da produção de enzimas superóxido dismutase (SOD) (STECCHINI et al. 2001), convertendo radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, e da glutatona peroxidase que elimina peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila (AMANATIDOU et al., 2001).

A presença de estresse oxidativo é de suma importância no desenvolvimento da mucosite, uma vez que pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias que amplificam o dano tecidual na mucosa intestinal (VILLA; SONIS, 2015). Desta forma, a mensuração destas citocinas é um parâmetro associado à lesão promovida por 5-FU na mucosite intestinal. Segundo Sonis (2004), o aumento destes mediadores inflamatórios ocorre em decorrência da ativação do fator de transcrição NF-κB em resposta aos danos primários

desencadeados pelo estresse oxidativo, estes por sua vez amplificam o processo inflamatório contribuindo para o dano tecidual. Dessa forma, a análise de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, é de suma importância para avaliação do desenvolvimento da mucosite intestinal e já tem sido mostrado que são marcadores associados ao tratamento de pacientes submetidos à terapia com 5-FU (MIWA; KOJIMA; NARUSE, 2001), alteração também já descrita em modelos experimentais (SOARES et al., 2013; JUSTINO et al., 2014; YEUNG et al., 2015; YUAN et al., 2015).

Em consonância com estudos prévios, no presente estudo, a administração de 5-FU aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos três segmentos intestinais analisados (duodeno, jejuno e íleo). Por outro lado, ambos os probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) demonstraram um importante potencial anti-inflamatório ao promover redução da produção desses mediadores. Em conformidade com estes dados, os probióticos *S. Boulardii*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. infantis* quando avaliados isoladamente, diminuíram a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 em modelo de mucosite induzida por 5-FU, exercendo assim atividade anti-inflamatória e prevenindo o desenvolvimento da inflamação intestinal (JUSTINO et al., 2014;2015, YEUNG et al., 2015;YUAN et al., 2015). Dessa forma, o efeito de inibição da produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 promovidos pelos probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) após a administração de 5-FU, pode ser considerado um fator chave na prevenção do dano tecidual observado no nosso estudo.

A intensa produção/liberação de citocinas pró-inflamatórias mediada por macrófagos e linfócitos é um importante aspecto para o desenvolvimento das alterações vasculares observadas na resposta inflamatória induzida pelo tratamento com quimioterápicos, desencadeando a ativação do endotélio vascular o qual culmina no aumento da expressão de moléculas de adesão, aumento da permeabilidade vascular e exacerbação do processo inflamatório (SONIS, 1998; PICO et al., 1998). Associado a esses eventos, as citocinas pró-inflamatórias tem a capacidade de promover quimiotaxia de polimorfonucleares (primariamente neutrófilos) para os tecidos inflamados, atuando como sinalizadores celulares que contribuirão para a fase de ulceração do tecido (WAGNER & ROTH, 2000). Logo, a imunomodulação desta citocinas pelos probióticos pode contribuir para a redução do acúmulo de neutrófilos no epitélio intestinal.

A presença de neutrófilos no sítio lesado é uma característica primordial dos processos inflamatórios (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982), isso ocorre devido sua capacidade de migrar dos vasos para os tecidos sob determinadas condições patológicas (WAGNER & ROTH, 2000). Estas células são consideradas componentes

centrais da resposta inflamatória, uma vez que agem sobre os mecanismos de fagocitose, produção de radicais livres, bem como na produção e ativação de mediadores inflamatórios (REAVES; CHIN; PARKOS, 2005). Outro importante mecanismo de ação dos neutrófilos é a liberação da enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos seus grânulos azurófilos, que causa lesão ao DNA, proteínas e lipídeos por meio da produção de ácido que reage com duplas ligações de lipídios ocasionando uma peroxidação lipídica, o que leva ao aumento da permeabilidade de membranas celulares (SGARBI et al., 2006). Assim, a mensuração da atividade desta enzima serve como parâmetro indireto para avaliar a presença de infiltrado neutrofílico nos tecidos (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

No presente estudo, foi observado que a administração de 5-FU promoveu aumento na atividade da MPO em todos os segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) e que o tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> reverteu esse aumento. Já está bem demonstrado na literatura que a mucosite intestinal induzida por 5-FU está associada ao aumento dos níveis da atividade de MPO (FERREIRA et al., 2012; SOARES et al., 2013). Neste sentido, trabalhos recentes utilizando *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em modelos de mucosite intestinal por 5-FU têm demonstrado atividades anti-inflamatórias, por mecanismos dependentes em parte da redução de citocinas pró-inflamatórias e do infiltrado de neutrófilos (JUSTINO et al., 2015; YUAN et al., 2015).

Em decorrência das alterações inflamatórias induzidas pelo tratamento quimioterápico, nesta fase de ulceração ocorre também perda da integridade da mucosa intestinal. Assim, mudanças morfológicas tais como a redução na área das vilosidades, foram demonstradas em seres humanos em tratamento com quimioterápicos (KEEFE et al., 2000). Essas alterações no epitélio intestinal são também observadas em modelos experimentais de mucosite intestinal induzida por 5-FU. Perda de arquitetura da mucosa, com redução do comprimento do intestino delgado, redução das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e presença de ulcerações foram bem caracterizadas em análises histopatológicas intestinais (FERREIRA et al., 2012; SOARES et al., 2013) e demonstram a perda da função de barreira epitelial funcional da mucosa intestinal, uma vez que essas alterações comprometem sua capacidade absorptiva e alteram padrões de permeabilidade (HOFSTAD, 1972; PODOLSKY, 1993).

Neste trabalho, foi observado que a administração de 5-FU promoveu diminuição da razão altura do vilo/profundidade da cripta na mucosa intestinal. Por outro lado, o tratamento com ambos os probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) reverteu essa alteração estrutural desencadeada pelo quimioterápico. Esses resultados corroboram com nossos dados

mostrados anteriormente, os quais sugerem que a redução do estresse oxidativo leva a uma redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-6, e consequente redução da migração neutrofílica, culminando na diminuição do dano tecidual. Tem sido demonstrado em modelo de mucosite intestinal por 5-FU que *S. boulardii*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. infantis* quando administrados de forma individualizada tem importante papel imunomodulador sobre citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e assim promovem manutenção da integridade da mucosa intestinal (JUSTINO et al., 2014;2015, YEUNG et al., 2015;YUAN et al., 2015). Neste sentido, nossos resultados demonstram a importância da inibição do processo inflamatório e suas repercussões sobre a integridade da mucosa, tendo em vista que a inibição dos eventos inflamatórios desencadeada pelo tratamento com Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> preveniu o desarranjo da arquitetura do epitélio intestinal.

Além dos eventos oxidativo e inflamatórios desencadeados pela administração de 5-FU, alterações na motilidade gastrointestinal são bastante prevalentes e na maioria das vezes associadas a sintomas, tais como dispepsia, disfagia e diarreia, como demonstrado em pacientes sob regime terapêutico, sendo dessa forma designados na clínica como síndrome dispéptica associada à quimioterapia do câncer (CADS) (RIEZZO et al., 2005). Nesse ponto de vista, Soares et al. (2008) demonstraram que a mucosite intestinal induzida por 5-FU está associada ao retardo no esvaziamento gástrico/trânsito intestinal de líquidos que ocorre tanto na fase inflamatória (3<sup>o</sup> dia) como na fase pós-inflamatória (15<sup>o</sup> dia) após o tratamento com 5-FU. No presente estudo, foi observado que administração de 5-FU promoveu intenso retardo no esvaziamento gástrico/trânsito intestinal quando analisado na fase inflamatória da mucosite intestinal. Por outro lado, o tratamento com os probióticos (Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup>) não apresentou efeito sobre esta análise funcional. Ademais, um efeito isolado promovido pelo tratamento com Probiatop<sup>®</sup> foi observado, a qual reverteu o retardo do esvaziamento gástrico promovido pela administração de 5-FU.

No entanto, o efeito exibido por Probiatop<sup>®</sup> sobre o retardo do esvaziamento gástrico induzido por 5-FU, pode não está associado ao seu efeito anti-inflamatório, uma vez que esta alteração já é bem descrita na fase pós-inflamatória em modelos de inflamação gastrointestinal. Corroborando com este ponto de vista, Soares et al. (2008) demonstrou de forma surpreendente que a mucosite intestinal induzida por 5-FU promove hiperresponsividade do duodeno a agentes contraturantes, tal como o carbacol, na fase inflamatória bem como na pós-inflamatória da mucosite intestinal induzida por 5-FU, sugerindo a persistência desta alteração mesmo com a resolução do processo inflamatório. Além disso, foi demonstrado em modelo de infecção de camundongos por *T. spirallis*, que

existe persistência de disfunção muscular (hiperresponsividade ao carbacol ou estimulação elétrica) à 42 dias após a infecção pelo patógeno, embora não houvesse infiltrado de neutrófilos (atividade de MPO em nível basal) ou alterações na morfologia da mucosa do jejuno (BARBARA, VALLANCE; COLLINS, 1997). De forma semelhante, Moreels et al. (2001) observou maior responsividade do íleo a acetilcolina (ACh) no período pós-inflamatório em modelo de ileite induzida por TNBS. Desta forma, sugere-se que existe a participação de outros fatores sobre a dismotilidade intestinal, dos quais, independe o processo inflamatório. Isto justificaria a ausência de efeito do Probiotil<sup>®</sup> sobre esta análise, uma vez que mesmo apresentando efeito anti-inflamatório não reverteu as alterações motoras gastrintestinais.

Em suma, nossos resultados sugerem que a utilização de Probiotil<sup>®</sup> ou Probiatop<sup>®</sup> associados à quimioterapia por 5-FU pode reduzir em parte os efeitos adversos gastrintestinais consequentes do tratamento quimioterápico. Contudo, estudos posteriores incluindo ensaios clínicos precisam ser conduzidos para desvendar os possíveis mecanismos de ação destes probióticos na lesão da mucosa intestinal induzida pela quimioterapia. Além disso, nossos dados contribuem para o entendimento da patogênese da mucosite intestinal, bem como fornecem subsídios para o discernimento das alterações motoras associada ao 5-FU, auxiliando na descoberta de novas alternativas terapêuticas para a mucosite intestinal.



## 8 CONCLUSÃO

- ✓ Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> não reverterem a leucopenia induzida pela administração com 5-FU.
- ✓ Probiatop<sup>®</sup> mas não o Probiotil<sup>®</sup> reverte a perda de peso induzida por 5-FU.
- ✓ Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> reduzem o estresse oxidativo induzido por 5-FU, ao reestabelecer níveis de antioxidante endógeno e diminuir a peroxidação lipídica.
- ✓ Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> reduzem a resposta inflamatória na mucosite intestinal induzida por 5-FU ao inibir a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, e o recrutamento de neutrófilos.
- ✓ Probiotil<sup>®</sup> e Probiatop<sup>®</sup> protegem a mucosa intestinal do desarranjo de vilos e criptas promovido pela administração de 5-FU.
- ✓ Probiatop<sup>®</sup> mas não Probiotil<sup>®</sup>, reverte o retardo do esvaziamento gástrico induzido por 5-FU. Além disso, ambos os probióticos não foram capazes de reverter as alterações sobre o trânsito intestinal.

## REFERÊNCIAS

- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences.**, v.75, p. 639-653, 2004.
- ALMEIDA, L.B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V.B.P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica.**, v. 24, p. 58-63, 2009.
- ALTMAN, G. G. Changes in the mucosa of the small intestine following methotrexate administration or abdominal x-irradiation. **American Journal of Anatomy.**, v. 140, p. 263-280, 1974.
- AMANATIDOU, A.; BENNIK, M.H.; GORRIS, L.G.; SMID, E.J. Superoxide dismutase plays an important role in the survival of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen. **Archives of Microbiology.**, v. 176, p. 79-88, 2001.
- ANDRADE, M.; SILVA, S.R. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem.**, v. 60, p 331-35, 2007.
- BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science.**, v. 307, p. 1915-1920, 2005.
- BARBARA, G.; VALLANCE, B. A.; COLLINS, S. M. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. **Gastroenterology.**, v.113, p. 1224-1232, 1997.
- BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism.**, v. 49, p. 3-8, 2000.
- BLIJLEVENS, N.; SONIS, S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. **Annals of Oncology.**, v. 18, p. 817-826, 2007.
- BONASSA, E. M. A.; SANTANA, T. R. **Enfermagem em Terapêutica Oncológica.**, v. 3, 2005.
- BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M.K. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support Care Cancer.**, v.14, p.713-731, 2006.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60, p. 618-622, 1982.
- BRANDAO, 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.**, v. 33, p. 1359–1369, 2010.
- BRANDT, K. G.; SAMPAIO, M. M. S. C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Pediatria.**, v. 28, p. 117-127, 2006.

BRASIL, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. Ministério da Saúde, 2016. Dispon. em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA-INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

BRITO, L. F.; SILVA, L. S.; FERNANDES, D. D.; PIRES, R. A.; NOGUEIRA, A. D. R.; SOUZA, C. L, et al. Perfil nutricional de pacientes com câncer assistidos pela casa de acolhimento ao paciente oncológico do sudoeste da Bahia. **Revista Brasileira de Câncer.**, v. 58, p. 163-71, 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. **Digestive Diseases and Science.**, v. 49, p. 65-72, 2004.

CIORBA, M.A.; HALLEMEIER, C.L.; STENSON, W.F.; PARIKH, P.J. Probiotics to prevent gastrointestinal toxicity from cancer therapy: an interpretive review and call to action. **Current Opinion Support and PalliativeCare.**,v. 91, p. 57-62, 2015.

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

DAI, D.; WALKER, W.A. Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. **Advances and Pediatric.**, v. 46, p. 353-382, 1999.

DONATO, K.A.; GAREAU, M.G.; WANG, Y.J.; SHERMAN, P.M. Lactobacillus rhamnosus GG attenuates interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced barrier dysfunction and proinflammatory signalling. **Microbiology.**,v. 156, p. 3288-3297, 2010.

DUGGAN, C.; GANON, J.; WALKER, W. A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition.**, v. 75, p. 789-808, 2002.

ELMER, G.W.; SURAWICZ, C.M.; MCFARLAND, L.V. Biotherapeutic agents: A neglected modality for the treatment and prevention of the intestinal and vaginal infections. **Journal of the American Association.**, v. 275, p. 870-876, 1996.

ELTING, L.S.; COOKSLEY, C.; CHAMBERS, M.; CANTOR, S.B.; MANZULLO, E.; RUBENSTEIN, E.B. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer.**, v. 98, p.1531–1539, 2003.

FABER, M.; COUDRAY, C.; HIDA, H.; MOUSSEAU, M.; FAVIER, A. Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer before and after

chemotherapy, including adriamycin. A preliminar study. **Biological Trace Element Research.**, v. 47, p. 117-123, 1995.

FAO/OMS –ORGANIZAÇÃO DE ALIMENTOS E AGRICULTURA/ ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Relatório do Grupo de Trabalho Conjunto sobre a definição de orientações para a avaliação de probióticos na alimentação. London, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: <: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>> Acesso em: 21 jan. 2016.

FAURE, H.; COUDRAY, C.; MOUSSEAU, M.; DUCROS, V.; DOUKI, T.; BIANCHINI, F.; CADET, J.; FAVIER, A. 5- hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin-treated patients. **Free Radical Biology & Medicine.**, v. 20, p. 979-983, 1996.

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

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.**, v.47, p.669–678, 2012.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition.**, v.29, p.15–21, 2013.

FULLER R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology.**, v. 66, p. 365–378, 1989.

GAO, K.; WANG, C.; LIU, L.; DOU, X.; LIU, J.; YUAN, L.; ZHANG, W.; WANG, H. Immunomodulation and signaling mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its components on porcine intestinal epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide. **Journal of Microbiology Immunology Infection.**, v. 14, p. 1684-1182, 2015.

GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; INGLIS, M. R. B.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology.**, v. 18, p. 1095-1100, 2003.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Supportive Care in Cancer.**, v.14, p.890-900, 2006.

GILL, S. R.; POP, M.; DEBOY, R. T.; ECKBURG, P. B.; TURNBAUGH, P. J.; SAMUEL, B. S. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science.**, v. 312, p. 1355–1359, 2006.

GOLDBERG ARNOLD, R. J.; GABRAIL, N.; RAUT, M.; KIM, R.; SUNG, J. C. Y.; ZHOU, Y. Clinical Implications of Chemotherapy-induced Diarrhea in Patients With Cancer. **The Journal of Supportive Oncology.**, v. 3, p. 227–232, 2005.

GREM, J.L. Mechanisms of Action and modulation of fluorouracil. **Seminars in Radiation Oncology**,v. 7, p. 249-259; 1997.

GUSTAFSSON, B. E. The physiological importance of the colonic microflora. **Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement**,v. 77, p. 117-131, 1982.

HARRIS, S. M.; MISTRY, P.; FREATHY, C.; BROWN, J. L.; CHARLTON, P. A. Antitumour activity of XR5944 in vitro and in vivo in combination with 5-fluorouracil and irinotecan in colon cancer cell lines. **British Journal of Cancer**,v. 92, p. 722-728, 2005.

HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; HUIS INT'VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. **Probiotics: the scientific basis**. London : Chapman e Hall., 1992. p.209-224,

HOFSTAD, M.S. **Diseases of poultry**. 6. ed. Ames: The Iowa State University Press, 1972. p. 1176.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.365-373, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109-116, 2002.

HOOPER, L. V.; GORDON, J. L. Commensal host-bacterial relationship in the gut. **Science**, v. 292, p. 1115-8, 2001.

HUANG, I-F.; LIN, I-C.; LIU, PEI-F.; CHENG, MING-F.; *et al.* Lactobacillus acidophilus attenuates Salmonella-induced intestinal inflammation via TGF- $\beta$  signaling. **BMC Microbiology**,v. 15, p. 203, 2015.

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER – UICC, 2006.**Access to Cancer Drugs: A UICC position paper Revision 2008/09**. Disponível em: <<http://www.uicc.org/access-cancer-drugs-uicc-position-paper-revision-200809>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2016.

JUSTINO, P. F.; MELO, L. F.; NOGUEIRA, A. F.; MORAIS, C. M.; MENDES, W. O.; FRANCO, A. X.; SOUZA, E. P.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H.; SOARES, P. M. Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacology**, v. 75, p. 559-67, 2015.

JUSTINO, P. F.; MELO, L. F.; NOGUEIRA, A. F.; COSTA, J. V.; SILVA, L. M.; SANTOS, C. M.; MENDES, W. O.; COSTA, M. R.; FRANCO, A. X.; LIMA; A. A.; RIBEIRO, R. A.;SOUZA, M. H.;SOARES, P. M. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 1611-1621, 2014.

KEEFE, D. M. K. Gastrointestinal mucositis: a new biological model. **Supportive Care in Cancer**, v. 12, p. 6-9, 2004.

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

KEEFE, D. M. K.; BREALEY, J.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, v. 47, p. 632-7, 2000.

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

KELLY, D.; KING, T.; AMINOV, R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. **Mutation Research**, v. 622, p.58-69, 2007.

KHAILOVA, L.; MOUNT PATRICK, S.K.; ARGANBRIGHT, K.M.; HALPERN, M.D.; KINOUCI, T.; DVORAK, B. *Bifidobacterium bifidum* reduces apoptosis in the intestinal epithelium in necrotizing enterocolitis. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 299, p. 1118– G1127, 2015.

KHAN, S. A.; WINGARD, J. R. Infection and mucosal injury in cancer treatment. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v, 29, p. 31-36, 2001.

KHANNA, R.; ANGER, C. Patterns of patients stopping their anti-cancer drug due to its associated side effects in France, Germany, Italy, Spain and UK (EU5). In: Congresso da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO), Madrid, Espanha, 2014. Complications of Treatment Supportive Care. **Annals of Oncology**, v. 25, p. 1-41, 2014.

KIM, Y. A.; CHUNG, H. C.; CHOI, H. J.; RHA, S. Y.; SEONG, J. S.; JEUNG, H. C. Intermediate dose 5-fluorouracil-induced encephalopathy. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 36, p. 55–59, 2006.

KISSOW, H.; VIBY, N. E.; HARTMANN, B.; HOLST, J. J.; TIMM, M.; THIM, L.; POULSEN, S. S. Exogenous glucagon-like peptide-2 (GLP-2) prevents chemotherapy-induced mucositis in rat small intestine. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 70, p. 39–48, 2012.

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

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 215-24, 2002.

LALLA, R. V.; PETERSON, D. E. Treatment of mucositis, including new medications. **The Cancer Journal**, v. 12, p. 348–54, 2006.

LEE, S.K.; YANG, K.M.; CHEON, J.H.; KIM, T.I.; KIM, W.H. Anti-inflammatory mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG in lipopolysaccharide-stimulated HT-29 cell. **The Korean Journal of Gastroenterology**, v. 60, p. 86-93, 2012.

- LEITAO, R. F. C.; BRITO, G. A. C; ORIÁ, R. B;BRAGA NETO, M. B.;BELLAGUARDA, E. A. L.;SILVA, J. V. GOMES A.S; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; SIQUEIRA, F. J. W. S; FREIRE, R. S; VALE, M.L.; RIBEIRO, R. A. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterology**, v.11, p.90, 2011.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p. 747-748, 1965.
- LOMBARDI, L.; MORELLI, F.; CINIERI, S.; SANTINI, D.; SILVESTRIS, N.; FAZIO,N.; ORLANDO, L.; TONINI, G.; COLUCCI, G.; MAIELLO, E. Adjuvant colon cancer chemotherapy: where we are and where we'll go. **Cancer Treatment Reviews**, v. 36, p. S34-S41, 2010.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Cancer**, v. 3, p. 330–338, 2003.
- LONGLEY, D.B.; ALLEN, W.L.; MCDERMOTT, U.; WILSON, T.R.; LATIF, T.; BOYER, J.; LYNCH, M.; JOHNSTON, P. G. The roles of thymidylate synthase and p53 in regulation mediated apoptosis in response to antimetabolites. **Clinical Cancer Research**,v. 10, p. 3562-3571, 2004.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-75, 1951.
- LUTGENDORFF, F.; AKKERMANS, L. M. A.; SÖDERHOLM , J. D. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage.**Current Molecular Medicine**,v. 8, p. 282-298, 2008.
- MACDONALD, D.R. in The Chemotherapy Source Book, M.C. Perry, Ed. Williams and Wilkins: **Baltimore**, p. 745-766, 1997.
- MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 478-485, 2004.
- MACPHERSON, B R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, p. 135-50, 1978.
- MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M.; Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 204-210, 2004.
- MARTINS, C. L.; FILHO, C. F.; DEL GIGLIO, A.; MUNHOES, D. A.; TREVIZAN, L. L.B.; HERBST, L. G., *et al.* Desempenho profissional ou doméstico das pacientes em quimioterapia para câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**,v. 55, p. 158-62,2009.
- MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, A.C.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, p. 1519-1530, 2005.

MCFARLAND, L.V. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. **Anaerobe.**, v. 15, p. 274-280, 2009.

MEGO, M.; CHOVANEC, J.; VOCHYANOVA-ANDREZALOVA, I.; KONKOLOVSKY, P.; MIKULOVA, M.; RECKOVA, M.; MISKOVSKA, V. et al. Prevention of irinotecan induced diarrhea by probiotics: A randomized double blind, placebo controlled pilot study. **Complementary Therapies in Medicine.**, v. 23, p. 356-362, 2015.

MEISTER, A. Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle. **Life Sciences.**, v. 15, p. 177-90, 1974.

MELO, E. M.; ARAÚJO, T. L.; OLIVEIRA, T.C.; ALMEIDA, D.T. Mulher mastectomizada em tratamento quimioterápico: um estudo dos comportamentos na perspectiva do modelo adaptativo de Roy. **Revista Brasileira de Cancerologia.**, v. 48, p. 21-8, 2002.

MIRPURI, J.; SOTNIKOV, I.; MYERS, L.; DENNING, T.L.; YAROVINSKY, F.; PARKOS, C.A.; DENNING, P.W.; LOUIS, N.A. *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) Regulates IL-10 Signaling in the Developing Murine Colon through Upregulation of the IL-10R2 Receptor Subunit. **PLoS One.**, v. 7, p. 1955, 2012.

MIYAZONO, Y.; GAO, F.; HORIE, T. Oxidative stress contributes to methotrexate induced small intestinal toxicity in rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology.**, v. 39, p. 1119-27, 2004.

MIWA, M.; KOJIMA, T.; NARUSE, T. Serum factors attenuating the anti-tumor activity of 5-fluorouracil. **Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals.**, v. 16, p. 317-322, 2001.

MOREELS, T. G.; DE MAN, J. G.; BOGERS, J.; DE WINTER, B. Y.; VROLIX, G.; HERMAN, A. G.; VAN MARCK, E. A.; PELCKMANS, P. A. Effect *Shistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation on murine gastrointestinal motility. **American Journal of Physiology.**, v. 280, p. G1030-G1042, 2001.

NASH, S.; STAFFORD, J.; MADARA, J. L. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. **Journal of Clinical Investigation.**, v. 80, p. 1104-1113, 1987.

NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S. C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflammatory Bowel Diseases.**, v. 15, p.300-310, 2009.

NIERS, L. E. M.; TIMMERMAN, H. M.; RIJKERS, G. T.; van BLEEK, G. M.; van UDEN, N. O. P.; KNOL, E. F.; KAPSENBERG, M. L.; KIMPEN, J. L. L.; HOEKSTRA, M. O. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. **Clinical and Experimental Allergy.**, v. 35, p. 1481-1489, 2005.

NOORDHUIS, P.; HOLWERDA, U.; van DER WILT, C. L.; van GROENING, C. J.; SMID, K.; MEIJER, S.; PINEDO, H. M.; PETERS, G. J. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidilate synthase inhibition of human colorectal cancers. **Annals Oncology.**, v. 15, p. 1025-1032, 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.**, v.113, p. 1489-1500, 1997.

OHASHI, Y.; USHIDA, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. **Journal of Animal Science.**, v. 80, p. 361–371, 2009.

OMGE- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA. **Guias práticas: Probióticos e Prebióticos.**, p.01-22, 2008.

PARSONS, P.E.; SUGAHARA, K.; COTT, G.R.; MASON, R. J.; HENSON, P. M. The effect of neutrophil migration and prolonged neutrophil contact on epithelial permeability. **The American Journal of Pathology.**, v.129, p. 302-312, 1987.

PETERSON, D. E.; BENSADOUN, R.-J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of Oncology.**, v. 22, p.vi78–vi84, 2011.

PHILIPPE, D.; FAVRE, L.; FOATA, F.; ADOLFSSON, O.; PERRUISSEAU-CARRIER, G.; VIDAL, K.; REUTELER, G.; DAYER-SCHNEIDER, J.; MUELLER, C.; BLUM, S. *Bifidobacterium lactis* attenuates onset of inflammation in a murine model of colitis. **World Journal of Gastroenterology.**, v. 17, p. 459–469, 2011.

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

PINEDO, H. M.; PETERS, G. F. Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. **Journal of Clinical Oncology.**, v.6, p.1653-1664, 1988.

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

PODOLSKY, D.K. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.**, v. 264, p. G179-G186, 1993.

POVOA, H. **Nutrição Cerebral, capítulo 18 (Mais Prazer na Vida Adulta)**– Editora Objetiva, 2005 .

RAKOFF-NAHOUM, S.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. **Mucosal Immunology.**, v. 1, p. 10–14, 2008.

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 100, p. 191–198, 2005.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut.**, v. 52, p. 988-997, 2003.

- REYNELL, R. S.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **Journal of Physiology.**, v. 131, p. 452-462, 1956.
- RIEZZO, G.; CLEMENTE, C.; LEO, S.; RUSSO, F. The role of electrogastrography and gastrointestinal hormones in chemotherapy-related dyspeptic symptoms. **Journal of Gastroenterology.**, v. 40, p. 1107–1115, 2005.
- RUTMAN, R. J.; CANTAROW, A.; PASCHKIS, K. E. The catabolism of uracil *in vivo* and *in vitro*. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 210, p. 321–329, 1954.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology.**, v. 84, p. 197-215, 2000.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal.**, v.8, p.563-572, 1998.
- SANTOS, P. S. da S.; MESSAGGI, A.C.; MANTESSO, A.; MAGALHÃES, M.H.C.G. Mucosite oral: perspectivas atuais na prevenção e tratamento. **Revista Gestão Organizacional.**, v. 57, p. 339-344, 2009.
- SARGENT, D. J.; MARSONI, S.; MONGES, G.; THIBODEAU, S. N.; LABIANCA, R.; HAMILTON, S. R.; FRENCH, A. J.; KABAT, B.; FOSTER, N. R.; TORRI, V.; RIBIC, C.; GROTHEY, A.; MOORE, M.; ZANIBONI, A.; SEITZ, J. F.; SINICROPE, F.; GALLINGER, S. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. **Journal of Clinical Oncology.**, v. 28, p. 3219–3226, 2010.
- 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.**, v. 10, p. 420–427, 2010.
- SGARBI, M.W.M.; da SILVA JUNIOR, B.A.; HUNGRIA NETO, J.S. The importance of systemic inflammatory response (SIRS) in the prognosis of polytraumatized patients. **Revista Brasileira de Ortopedia.**, v.41, p.1-6, 2006.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry.**, v. 25, p. 1192–1205, 1968.
- 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.**, v. 1072, p. 262–275, 2006.
- SHERMAN, P. M.; OSSA, J. C.; JOHNSON-HENRY, K. Unravelling mechanisms of action of probiotics. **Nutrition in Clinical Practice.**, v. 24, p. 10-14, 2009.
- SHINYA, H. **A dieta do futuro: que previne cardiopatias cura o câncer e controla o diabetes tipo 2.** São Paulo: Cultrix, 2010.

SIMEOLI, R.; RASO, G.M.; LAMA, A.; PIROZZI, C.; SANTORO, A.; DI GUIDA, F.; SANGERS, M.; AKSOY, E.; CALIGNANO, A.; D'ARIENZO, A.; MELI, R. Preventive and Therapeutic Effects of *Lactobacillus paracasei* B21060–Based Synbiotic Treatment on Gut Inflammation and Barrier Integrity in Colitic Mice. **The Journal of Nutrition Nutrition and Disease.**, v. 145, p. 1202–1210, 2015.

SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. Intestinal microflora. **Medical Clinics of North America.**, v. 66, p. 557-574, 1982.

SINICROPE, F. A.; LEVIN, B. Complications of cancer and its treatment: Gastrointestinal complications. apud BAST, J. R.; R.C.; KUFÉ, D. W.; POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R. R.; HOLLAND, J. F.; FREI III, E.; GANSLER, T. S. **Cancer Medicine.**, ed. 5, cap. 152, NCBI, 5<sup>th</sup> edition, Ontario, CA, 2000.

SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M. S. C.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; BRITO, G. A. C.; SANTOS, A. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Gastrointestinal dysmotility in 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology.**, v. 63, p. 91–98, 2008.

SOARES, P. M.; MOTA, J. M.; SOUZA, E. P.; JUSTINO, P. F.; FRANCO, A. X.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine.**, v. 61, p. 46–49, 2013.

SONIS ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncology.**, v. 34, p. 39-43, 1998.

SONIS, S. T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. **Oral Oncology.**, v. 45, p. 1015–1020, 2009.

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

SONIS, S. T.; ELTING, S. L.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, P. D.; RUBENSTEIN, E.B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. **Cancer.**, v. 100, p. 1995-2025, 2004.

STECCHINI, M.L.; DEL TORRE, M.; MUNARI, M. Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology.**, v. 28 p. 8, 2001.

STEWART, B. W.; WILD, C. P.; World Cancer Report 2014. **International Agency for Research on Cancer (IARC-OMS)**. Lyon, France, 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.**, v. 234, p. 430-441, 2009.

STRINGER, A.; GIBSON, R.; LOGAN, R.; BOWEN, J.; YEOH, A.; KEEFE, D. Faecal microflora and  $\beta$ -glucuronidase expression are altered in an irinotecan-induced diarrhoea model in rats. **Cancer Biology and Therapy**, v. 7, p. 1919-1925, 2008.

SULTANI, M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy induced gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy Research and Practice**, v.2012, p.1-11, 2012.

SUN, F.; HAYAMI, S.; OGIRI, Y.; HARUNA, S.; TANAKA, K.; YAMADA, Y.; TOKUMARU, S.; KOJO, S. Evaluation of oxidative stress based on lipid hydroperoxide, vitamin C and vitamin E during apoptosis and necrosis caused by thioacetamide in rat liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1500, p. 181-185, 2000.

TOUMI, R.; SOUFLI, I.; RAFA, H.; BELKHELFA, M.; BIAD, A.; TOUIL-BOUKOFFA, C. Probiotic bacteria lactobacillus and bifidobacterium attenuate inflammation in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 27, p. 615-627, 2014.

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.C. Microbiota ou Flora Normal do Corpo Humano. **Microbiologia**. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. pág. 101-174. Ed. Atheneu, 4<sup>o</sup> Edição, 2004.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. **Nature**, v. 449, p. 804–810, 2007.

UENO, N.; FUJIYA, M.; SEGAWA, S.; NATA, T.; MORIICHI, K.; TANABE, H.; MIZUKAMI, Y.; KOBAYASHI, N.; ITO, K.; KOHGO, Y. Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, p. 2235-50, 2011.

van YE, T. M.; ROZA, A. M.; PIEPER, G. M. Inhibition of intestine lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. **Journal of Surgical Research**, v. 55, p. 553-558, 1993.

VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis: pathobiology and management. **Current Opinion**, v. 27, p. 159 -164, 2015.

VLIET, M. J. van; HARMSSEN, 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**, v.6, p.e.1000879, 2010.

von BÜLTZINGSLÖWEN, I.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A. E.; DAHLÉN, G.; JONTELL, M. Oral and intestinal microflora in 5-Fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, v.18, p.278–284, 2003.

von BÜLTZINGSLÖWEN, I.; BRENNAN, M. T.; SPIJKERVET, F. K. L.; LOGAN, R.; STRINGER, A.; RABER-DURLACHER, J. E.; KEEFE, D. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. **Support Care Cancer**, v.14, p. 519–527, 2006.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews.**,v. 52, p. 349-74, 2000.

WEIJL, N.I. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. **Annals of Oncology.**, v.9, p.1331-1337, 1998.

WU, Z. Q.; HAN, X. D.; WANG, Y.; YUAN, K. L.; JIN, Z. M.; DI, J. Z.; YAN, J.; PAN, Y.;ZHANG, P.; HUANG, X. Y.; WANG, Z. G.; ZHENG, Q. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-Fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology.**,v.68, p.87–96, 2011.

XING, J.; WANG, G.; ZHANG, Q.; LIU, X.; GU, Z, ZHANG, H.; CHEN, Y.Q.; CHEN, W. Determining Antioxidant Activities of Lactobacilli Cell-Free Supernatants by Cellular Antioxidant Assay: A Comparison with Traditional Methods. **PLoS ONE.**,v. 10, p. 0119058, 2015.

YEUNG, C-Y.; CHAN, W-T.; JIANG, C-B.; CHENG, M-L.; LIU, C-Y.; CHANG, S-W., *et al.* Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. **PLoS ONE.**,v. 10, p. 01-16, 2015.

YUAN, K.T.; YU, H.L.; FENG, W.D.; CHONG, P.; YANG, T.; XUE, C.L.; YU, M.; SHI, H.P. *Bifidobacterium infantis* has a beneficial effect on 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Beneficial Microbes.**, v. 6, p. 113-118,2015.

## ANEXO A




Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DE PROBIÓTICOS COMPOSTOS POR *LACTOBACILLUS SPP.* E *BIFIDOBACTERIUM SPP.* NA FISIOPATOLOGIA DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS", protocolo nº87/2015, sob responsabilidade do Prof. Dr Pedro Marcos Gomes Soares, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 11 de novembro de 2015.

Vigência do projeto	04/08/2015 a 04/08/2016
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de Animais	400
Peso/Idade	20-30g – 8-16 semanas
Sexo	Machos/Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 19 de novembro de 2015

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador da CEUA - UFC  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E BOM USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Suse: 1520754