



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

LÍVIA MARIA SOARES NOBRE

**PARAPROBIÓTICO BASEADO EM *Enterococcus faecalis* PROTEGE DA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2022

LÍVIA MARIA SOARES NOBRE

PARAPROBIÓTICO BASEADO EM *Enterococcus faecalis* PROTEGE DA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N672p Nobre, Livia Maria Soares.
Paraprobiótico baseado em enterococcus faecalis protege da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos / Livia Maria Soares Nobre. – 2022.
81 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. Irinotecano. 2. Enterococcus faecalis. 3. Mucosite. I. Título.

CDD 615.1

LÍVIA MARIA SOARES NOBRE

PARAPROBIÓTICO BASEADO EM *Enterococcus faecalis* PROTEGE DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof Vasco Ariston de Carvalho Azevedo
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof Maria do Carmo Gouveia Peluzio
Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Prof Diego Veras Wilke
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus e meu Arcanjo Miguel.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior, pela orientação, conselhos e por sempre estar disponível para retirar qualquer tipo de dúvida que pudesse surgir.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (in memoriam), eternamente lembrado por qualquer um que tenha tido o prazer de conviver com ele no laboratório.

À Profa. Ana Paula Negreiros pela disponibilidade para realização das análises histológicas.

À Juliana Geraix, pela disponibilização dos paraprobióticos utilizados nesse estudo.

À minha família, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

Aos colegas do LAFICA, pela companhia e auxílio nas diversas vezes que precisei, em especial Jussara Rodrigues e Marina Helena, por todo companheirismo dentro e fora do laboratório, tornando tudo mais leve e divertido.

Às minhas amigas/irmãs Anielle Torres e Camila Meirelles, sempre presentes nos meus dias, independente da distância.

Às colegas e técnicos do Laboratório de Farmacologia Bioquímica, pelas várias vezes que me ajudaram durante a realização desse estudo.

Aos técnicos do Biotério Setorial do departamento de Fisiologia e Farmacologia, Aauto, Haroldo e Moreira, por me ajudarem sempre que necessário.

À Universidade Federal do Ceará, minha segunda casa durante 12 anos.

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo.

*“Tudo o que temos que decidir é o que fazer
com o tempo que nos é dado.”*

John Ronald Reuel Tolkien

RESUMO

Introdução. Irinotecano apresenta como efeito colateral a mucosite intestinal (MI), que reconhecidamente altera a microbiota intestinal, e apesar dos diversos estudos realizados para elucidar os mecanismos através dos quais a MI se desenvolve, ainda não há tratamento preventivo eficaz. Paraprobióticos são compostos formados por bactérias inativadas que têm a capacidade de reequilibrar a microbiota do intestino, modular a resposta imune e manter a integridade da junção intercelular, sendo uma alternativa interessante e segura para prevenção da MI. **Objetivos.** Esse estudo testou o efeito protetor do paraprobiótico purificado de *Enterococcus faecalis* (EC-12) e uma formulação à base de *E. faecalis* (Med Lan-S) sobre o modelo de mucosite induzida por irinotecano em camundongos. **Metodologia.** Camundongos C57BL/6 machos receberam salina, irinotecano (75 mg/kg, i.p.), EC-12 (0,3, 1, or 3×10^7 UFC/kg, v.o.) + irinotecano ou Med Lan-S (3×10^7 UFC/kg, v.o.) + irinotecano. A variação do peso corporal foi avaliada diariamente, e amostras de sangue foram coletadas para a determinação de bacteremia e contagem de leucócitos. Amostras de íleo foram coletadas para realização de ensaio de myeloperoxidase, análise histopatológica, PCR e imunofluorescência para macrófagos (F4/80), TLR4, e proteína de ligação à IL-18 (IL-18BP). **Resultados.** Os melhores resultados foram observados com a administração de EC-12 a 3×10^7 UFC/kg começando uma semana antes do irinotecano. EC-12 e Med Lan-S não impediram a perda de massa corporal induzida pelo irinotecano nem a leucopenia, mas atenuaram a infiltração de neutrófilos no intestino e aumentaram a razão vilo/cripta ($p < 0,05$). Além disso, EC-12 e Med Lan-S reduziram a expressão do mRNA de *Cldn-2*, *Ocln* e *Tlr4* versus o grupo irinotecano ($p < 0,05$). Irinotecano também aumentou a expressão de *IL-18* e a marcação por imunofluorescência de F4/80, IL18BP e TLR4, enquanto apenas o EC-12 reduziu a expressão de todos estes marcadores. Notavelmente, tanto EC-12 como Med Lan-S inibiram a translocação bacteriana induzida pelo irinotecano para o sangue. **Conclusão.** O paraprobiótico de *E. faecalis* EC-12 previne o desenvolvimento de mucosite intestinal ao infra-regular a resposta inflamatória. Med Lan-S também protege contra a mucosite. Possivelmente, a complexidade da formulação do Med Lan-S é responsável por um mecanismo de proteção imunológica inata.

Palavras-chave: Irinotecano; *Enterococcus faecalis*; Mucosite.

PARAPROBIOTIC BASED ON *Enterococcus faecalis* PROTECTS FROM IRINOTECAN-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE

Introduction. Irinotecan have as a side effect intestinal mucositis (IM), which is known to alter the intestinal microbiota, and despite the many studies conducted to elucidate the mechanisms by which it develops, it still has no preventive treatment. Paraprobiotics are compounds made of inactivated bacteria that have the ability to balance the gut microbiota, modulate the immune response and maintain the integrity of the intercellular junction zone, being an interesting and safe alternative for the prevention of IM.

Objective. This study aimed to test the protective effect of paraprobiotic *Enterococcus faecalis* (EC-12) on irinotecan-induced intestinal mucositis. **Material and Methods.** C57BL/6 male mice received saline, irinotecan (75 mg/kg, i.p), EC-12 (0.3, 1 or 3 x 10⁷ CFU/kg, p.o.) + irinotecan or Med Lan-S (paraprobiotic-based formulation, 3 x 10⁷ CFU/kg, p.o.) + irinotecan. Body mass variation was assessed daily, and blood samples were collected for bacteremia evaluation. After euthanasia, the ileum was harvested for myeloperoxidase assay, histopathology, quantitative PCR, and immunofluorescence for macrophages (F4/80) and TLR4 expression. **Results.** The optimal therapeutic strategy was verified when EC-12, administered at 3 x 10⁷ CFU/kg, started one week before the first irinotecan injection. EC-12 and Med Lan-S did not prevent the irinotecan-induced body mass loss. Conversely, EC-12 and Med Lan-S attenuated the irinotecan-induced neutrophil infiltration in the intestine and increased the villus/crypt ratio ($P < 0.05$). Additionally, EC-12 and Med Lan-S reduced the mRNA expression of *Cldn-2*, *Ocln*, and *Tlr4* versus the irinotecan group ($P < 0.05$). Remarkably, irinotecan augmented the expression of *Il-18*, but only EC-12 was able to reduce its expression. The pre-treatment with EC-12, but not Med Lan-S, reduced the immunofluorescence of F4/80 and Tlr4 to similar levels as the saline group. Furthermore, EC-12 and Med Lan-S inhibited the bacterial translocation to the blood. **Conclusion.** Paraprobiotic EC-12 prevents the development of intestinal mucositis by downregulating the inflammatory response. Despite the protection provided by the paraprobiotic formulation (Med Lan-S), its complexity accounts for an innate immune-driven protective mechanism.

Keywords: Irinotecan; *Enterococcus faecalis*; Mucositis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Número estimado de novos casos de câncer no mundo, em 2020, ambos os sexos, todas as idades
- Figura 2 – Estrutura molecular do irinotecano e seu metabólito SN-38
- Figura 3 – Protocolo I
- Figura 4 – Protocolo II
- Figura 5 – O tratamento por curto tempo com paraprobióticos não evita a perda de massa corporal ou a infiltração de neutrófilos.
- Figura 6 – O tratamento com EC-12 ou Med Lan-S não conseguiu evitar os danos intestinais induzidos pelo irinotecano.
- Figura 7 – Efeito do pré-tratamento com EC-12 ou Med Lan-S sobre a infiltração de neutrófilos no íleo dos animais tratados com irinotecano 75 mg/kg.
- Figura 8 – Os paraprobióticos reduzem a infiltração de neutrófilos no intestino durante a mucosite e não afetam a mielotoxicidade associada ao irinotecano.
- Figura 9 – Variação da massa corporal. A injeção de irinotecano causa perda de massa corporal. A administração de paraprobióticos não impede a variação da massa corporal.
- Figura 10 – O paraprobiótico evita danos histopatológicos.
- Figura 11 – EC-12 e Med Lan-S mantêm a integridade intestinal e previnem a bacteremia.
- Figura 12 – Expressão do mRNA de *Tlr4* e *Il-18*.
- Figura 13 – Imunofluorescência para o marcador de macrófagos F4/80 no íleo.
- Figura 14 – Imunofluorescência para TLR4 no íleo.
- Figura 15 – Imunofluorescência para a proteína de ligação de IL-18 (IL-18BP).
- Figura 16 – Quantificação da área fluorescente de F4/80, TLR4, e IL-18BP.
- Figura 17 – Resumo gráfico

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Probióticos, prebióticos, simbióticos, paraprobióticos e pós-bióticos: definições
- Tabela 2 – Escores histopatológicos para análise de intestino delgado
- Tabela 3 – Sequência de primers para Real-time PCR utilizados no estudo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
ANOVA	Análise de variância
BHI	Brain heart infusion
CCR	Câncer colorretal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPT-11	Camptotecina
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
HE	Hematoxilina-eosina
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFN- γ	Interferon gama
i.p.	Intraperitoneal
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-18bp	Proteína de ligação da IL-18
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRI	Irinotecano
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
MPO	Mieloperoxidase

mRNA	RNA mensageiro
Myd88	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de sódio
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
OZ-1	Zona occludens-1
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PFA	Paraformaldeído
PBS	Tampão salina fosfato
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SN38	7-etil-10-hidroxicamptotecina
SN38G	SN-38 glicuronídeo
SPF	Specific pathogen-free
TLR	Receptor Toll-like
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 1
Th17	Linfócito T helper 17
TRAF6	Receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 6
Treg	Linfócito T regulatório
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via oral
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
γ	gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
cm	Centímetros
g	Grama
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μL	Microlitro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Câncer colorretal	16
1.2	Irinotecano	18
1.3	Mucosite intestinal induzida por irinotecano	20
1.4	Paraprobióticos	25
1.5	<i>Enterococcus faecalis</i>	30
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral	33
3.2	Específicos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Animais	34
4.2	Drogas	34
4.3	Paraprobióticos	34
4.4	Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano	34
4.5	Protocolos experimentais	35
4.5.1	<i>Protocolo I</i>	35
4.5.2	<i>Protocolo II</i>	35
4.6	Avaliação dos parâmetros gerais de indução da mucosite	36
4.6.1	<i>Avaliação Ponderal</i>	36
4.6.2	<i>Contagem total de leucócitos</i>	36
4.6.3	<i>Análise histopatológica e morfometria do intestino</i>	37
4.7	Ensaio de mieloperoxidase (MPO)	38
4.8	Expressão de <i>Cldn-2</i>, <i>Ocln</i>, <i>Tlr4</i> e <i>Il-18</i> por RT-qPCR	38
4.9	Imunofluorescência	39
4.10	Avaliação da bacteremia após a indução da mucosite intestinal	40
4.11	Análise estatística	41
5	RESULTADOS	42
5.1	Protocolo I	42
5.2	Protocolo II	45

6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	64
8	ANEXO: Artigo publicado referente aos resultados da tese	66
9	REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

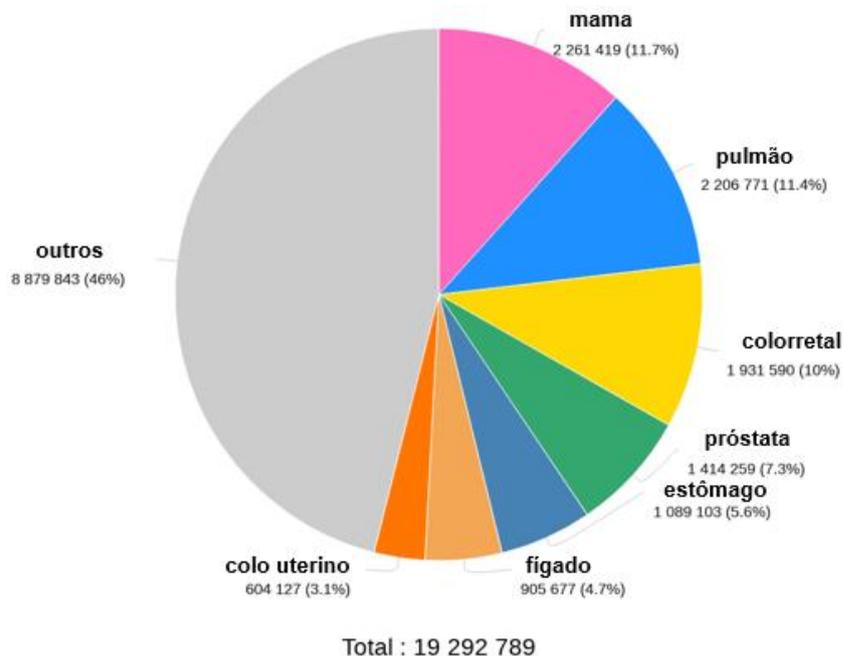
1.1 Câncer colorretal

Câncer é um termo que representa um conjunto de mais de 100 tipos de doenças malignas caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que exploram os mecanismos de organização celular e podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância (INCA, 2022).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), câncer é a segunda principal causa de óbitos no mundo, e a consequência disto é que em 2020 estima-se que esta enfermidade tenha sido responsável por dez milhões de mortes. Praticamente uma em cada seis mortes são em decorrência de câncer. Vale ressaltar que cerca de 70% dos óbitos ocorrem em países em desenvolvimento (WHO, 2021).

Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais frequente em homens e o segundo em mulheres, com cerca de 1,93 milhões de novos casos diagnosticados em 2018 e aproximadamente 935.000 mortes (WHO, 2021). A incidência de CCR apresenta tendência a aumentar nos países desenvolvidos, e os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento deste são dieta, resposta inflamatória, alterações do DNA, polimorfismos genéticos e alterações na microbiota intestinal (KOLIARAKIS *et al.*, 2018, apud WATSON & COLLINS, 2011).

Figura 1. Número estimado de novos casos de câncer no mundo, em 2020, ambos os sexos, todas as idades.



Fonte: Adaptado de World Health Organization; Global cancer observatory, International agency for research on cancer, 2021.

Os sintomas apresentados pelos pacientes com câncer colorretal são variáveis, e os tumores podem ser assintomáticos por longos períodos. Estes sintomas, que podem resultar de obstrução, perfuração e sangramento, incluem dor abdominal, hematoquezia, perda de peso, anemia, mudança no hábito intestinal e massa abdominal. As lesões colônicas do lado direito frequentemente causam dor epigástrica vaga e perda crônica de sangue levando à fadiga relacionada à anemia, enquanto pacientes com tumores no cólon esquerdo frequentemente apresentam sintomas de obstrução, constipação ou alteração no calibre das fezes (MAJUMDAR, FLETCHER & EVANS, 1999).

A evolução da terapia antineoplásica permitiu o tratamento curativo de muitas neoplasias malignas antes consideradas fatais, e o surgimento de novos fármacos atuantes na terapia do câncer levaram a uma melhora considerável na qualidade de vida dos pacientes e aumento da sobrevida destes (BRUNTON, 2012).

Os compostos antineoplásicos apresentam diferenças estruturais e podem atuar através de diversos mecanismos, como por exemplo, agentes alquilantes, análogos antimetabólitos do ácido fólico, das pirimidinas e das purinas, produtos naturais,

hormônios e agentes alvo-específicos. Dentre as estratégias empregadas pelos antineoplásicos para conter a proliferação das células cancerosas, temos a inibição da divisão celular através da interação com o complexo DNA-topoisomerase I, mecanismo pelo qual atua o irinotecano, fármaco utilizado nos protocolos de tratamento do câncer colorretal e outros tumores sólidos (MATHIJSEN *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2000).

1.2 Irinotecano

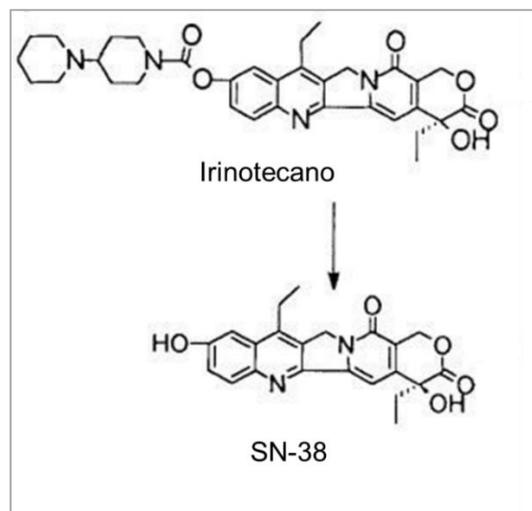
O irinotecano (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonitoxi-camptotecina ou CPT-11), juntamente com topotecano, são derivados hidrossolúveis da camptotecina, um alcalóide presente na árvore *Camptotheca acuminata* (WALL & WANI, 1995). O alvo dos derivados de camptotecina é a enzima Topoisomerase-1, a qual faz parte de um grupo de enzimas essenciais ao processo de replicação do DNA. Essa enzima concentra-se na região de super-espirilação de cromatina e tem a capacidade de relaxar tanto o superenrolamento positivo como o negativo da fita dupla de DNA (WANG, 2002). Após o relaxamento das fitas de DNA, a topoisomerase-1 atua religando as regiões que foram clivadas, através da reversão das ligações crovalentes (XU *et al.*, 1998; POURQUIER *et al.*, 1999). Pela ligação à essa enzima, irinotecano impede o reparo da fita-dupla, impossibilitando, dessa forma, a divisão celular (BRUNTON, 2012). Estudos recentes indicam que irinotecano não apresenta apenas topoisomerase-1 como alvo, mas também interage com MDM2 (murine double minute 2), proteína inibidora do supressor tumoral p53, Bcl-xL, proteína anti-apoptótica (LEE *et al.*, 2019) e com o oncogene FUBP1 (Far upstream element-binding protein 1) (KHAGEH HOSSEINI *et al.*, 2017).

Aprovado primeiramente no Japão, em 1994, para o tratamento do câncer cervical, de pulmão e de ovário, irinotecano até os dias atuais permanece como uma das principais drogas antineoplásicas utilizadas no tratamento de tumores sólidos dentre eles o colorretal, pulmonar de não pequenas células, pancreático, do trato biliar e gástrico, sendo usado tanto em crianças como adultos (FUJITA *et al.*, 2015; MAKIMOTO *et al.*, 2019). Apesar da possibilidade de ser utilizado como monoterapia, irinotecano é comumente associado a outros agentes citotóxicos, principalmente 5-fluorouracil e oxaliplatina, e anticorpos como bevacizumab e cetuximab. Além disso, estudos indicam também que

irinotecano pode ser combinado com inibidores de quinase e inibidores de *checkpoint* de ciclo celular (BAILLY *et al.*, 2019).

O efeito antineoplásico do irinotecano deve-se basicamente ao seu metabólito ativo SN-38, o qual é de cem a mil vezes mais potente que o irinotecano, além de possuir tempo de meia-vida superior em até 12 horas (RIVORY *et al.*, 1995). Irinotecano é hidrolisado em SN-38 por duas isoformas de carboxilesterases (CbE1 e CbE2), localizadas no fígado, cólon, rins e células sanguíneas, e uma butirilcolinesterase localizada no plasma (RUDAKOVA *et al.*, 2011). Apenas 2 – 5% do irinotecano é convertido em SN-38, e a sua depuração se dá no fígado via glucuronização a SN-38G pela uridina-difosfato glucuroniltransferase e posterior excreção na bile (RIVORY & ROBERT, 1995). Além dessa via, o fármaco também é metabolizado no fígado pela ação das enzimas do citocromo P450 CYP3A4 e CYP3A5 aos metabólitos inativos APC e NPC (SANTOS *et al.*, 2000). A eliminação se dá através das fezes (60 – 70%), bile (25%) ou urina (10 – 20%) (KANEDA *et al.*, 1997).

Figura 2. Estrutura molecular do irinotecano e seu metabólito SN-38



Fonte: Rivory *et al.*, 1996.

Apesar do tratamento quimioterápico à base de irinotecano aumentar a sobrevida de pacientes com CCR metastático em mais de 30 meses, a sua não-seletividade para a topoisomerase-1 no alvo tumoral leva à inibição da proliferação de células não-cancerosas e dessa forma induz toxicidade grave em cerca de 36% dos pacientes, sendo a mielossupressão e a diarreia os efeitos mais predominantes e dose-limitantes (FUCHS *et al.*, 2003; KWEEKEL *et al.*, 2008; FUJITA *et al.*, 2015).

O tratamento quimioterápico à base de irinotecano é acompanhado por um dano à mucosa intestinal com perda do epitélio intestinal e aumento de apoptose (IKUNO *et al.*, 1995) que comprometem a capacidade absorptiva do órgão, ocasionando dessa forma o desenvolvimento de diarreia. A diarreia provocada por irinotecano divide-se em aguda e tardia. A diarreia aguda acontece de uma a vinte e quatro horas após a administração de irinotecano e é causada devido à similaridade estrutural entre irinotecano e acetilcolina, sendo denominada diarreia colinérgica (ABIGERGES *et al.*, 1995). Além da diarreia, são observados também outros sintomas como cólicas, hipersalivação e distúrbios de acomodação visual, os quais são facilmente prevenidos pela administração subcutânea de atropina (ROUGIER *et al.*, 1997). Já a diarreia tardia aparece após 24 horas de administração e sua duração pode ter relação com a dose do quimioterápico utilizado. Esse tipo de diarreia atinge até 80% dos pacientes e 25% deles apresentam graus que variam entre 3 e 4 (KEEFE *et al.*, 2007).

Além da atropina para o controle dos efeitos colinérgicos agudos, a terapia aplicada na clínica também consiste na utilização de altas doses de loperamida no início de qualquer evacuação com fezes moles, no caso da diarreia tardia, conduta terapêutica que reduz a incidência de diarreia grave (graus 3 e 4) (PITOT *et al.*, 1997, apud KWEEKEL *et al.*, 2008). Já a leucopenia observada nos pacientes é reduzida pela utilização do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), e as orientações recentes adotam o limiar de neutropenia febril de 20% para que se inicie a utilização desse fator (TEREZAWA *et al.*, 2015; RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

Devido à falta de especificidade dos antineoplásicos para células tumorais, essas drogas, ao agirem em células saudáveis, desencadeiam importantes efeitos colaterais. No caso do irinotecano, a mucosite intestinal prejudica a qualidade de vida dos pacientes e o seguimento da quimioterapia, podendo levar inclusive à interrupção da mesma.

1.3 Mucosite intestinal induzida por irinotecano

A mucosite do trato gastrointestinal consiste numa toxicidade que acompanha vários tipos de tratamentos quimio e radioterápicos, caracterizada pela alteração da barreira mucosa intestinal, resultando em (1) ulceração que culmina com a passagem de bactérias intestinais para a circulação sistêmica, e (2) diarreia, como resultado do

desequilíbrio entre absorção e secreção (SONIS *et al.*, 2004; STEIN, *et al.*, 2010, KEEFE *et al.*, 2015). Pacientes acometidos por mucosite apresentam manifestações clínicas como ulceração oral, náusea, vômitos e diarreia, esta última com ou sem dor, quando o trato gastrointestinal é atingido (PETERSON, 2011).

Os sintomas citados anteriormente causam considerável dano à qualidade de vida dos pacientes, afetando não só a absorção de nutrientes, como também a progressão do esquema terapêutico, levando à redução das doses de antineoplásicos, interrupção temporária ou suspensão do tratamento, aumento da necessidade de hospitalização e ocasionalmente morte (POKROWIECKI *et al.*, 2017). O impacto da mucosite na qualidade de vida dos pacientes é difícil de ser estimado precisamente devido à alta taxa de sub-notificações e a notificação seletiva apenas dos casos mais graves de diarreia (graus 3 ou 4) (CIRILLO *et al.*, 2009; SONIS *et al.*, 2014). Além disso, poucos são os pacientes que se submetem a endoscopia para comprovar a presença de inflamação na mucosa (TOUCHEFEU *et al.*, 2014). No entanto, estima-se que cerca de 50 a até 100% dos pacientes podem ser afetados por esse efeito colateral (GIBSON *et al.*, 2009). Acompanhando o grave quadro clínico que se instala, temos como consequência um custo estimado de aproximadamente 97.000 reais por ciclo quimioterápico, como resultado não só do tratamento em si, mas também do aumentado risco de infecções, número de internações e necessidade de utilização de terapias de suporte (CARLOTTO, *et al.*, 2013; LALLA *et al.*, 2014).

A utilização de glutamina, antibióticos, fatores estimuladores de colônia de granulócitos e macrófagos falham em controlar a mucosite, que não apresenta nenhum tratamento curativo (PETERSON *et al.*, 2011), sendo o manejo clínico limitado à utilização de fármacos para o alívio da dor e utilização da loperamida, um opióide não-analgésico, para contenção dos eventos diarreicos (GIBSON *et al.*, 2007).

O Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) desenvolveu ao longo dos anos modelos experimentais de mucosite intestinal buscando reproduzir o observado nos pacientes, e dessa forma elucidar os mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento.

Em uma primeira tentativa do nosso grupo de indução de mucosite por irinotecano em animais, Melo e colaboradores, baseando-se no estudo de Ikuno (1995), padronizaram o modelo de mucosite em camundongos utilizando irinotecano na dose de 75 mg/kg, por via intraperitoneal, durante quatro dias consecutivos. Realizando eutanásia no quinto ou

no sétimo dia, os autores observaram significativa diarreia no sexto e sétimo dia após o início do tratamento, reduzida consideravelmente por pentoxifilina, além de danos à conformação normal do epitélio intestinal, com encurtamento de vilos, perda de arquitetura das criptas e infiltração de células inflamatórias na lâmina própria. O processo inflamatório envolve a participação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e KC (citocina análoga à IL-8 humana nos camundongos), e a utilização de pentoxifilina e talidomida reduziu consideravelmente os danos intestinais, o infiltrado de neutrófilos no intestino e os níveis de IL-1 β e TNF- α , além de KC (somente pentoxifilina) (MELO *et al.*, 2008).

Em outro estudo, dessa vez tratando os animais com irinotecano na dose de 60 mg/kg e realizando a eutanásia no quinto dia após o início do tratamento com o quimioterápico, observou-se a importância de outro mediador inflamatório na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano, o óxido nítrico. Os autores utilizaram-se de modulação genética (camundongos knockout para a enzima óxido nítrico sintase induzível) ou farmacológica (aminoguanidina), e mostraram que ambos preveniram o desenvolvimento da lesão intestinal, diarreia e infiltração de neutrófilos no intestino, além disso, animais knockout apresentaram os níveis de IL-1 β e KC reduzidos (mas não TNF- α) (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Guabiraba e colaboradores detectaram que irinotecano também induz o aumento da produção de IL-33, de forma concentração-dependente, e do seu receptor solúvel sST2, e o bloqueio com anticorpo anti-IL-33 ou contra sST2 atenuou significativamente a mucosite (GUABIRABA *et al.*, 2014). Outra citocina de grande importância no contexto da mucosite induzida por irinotecano é a IL-18, a qual, juntamente com TNF- α , outra citocina pró-inflamatória, aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando à produção de óxido nítrico e radicais, exacerbando a inflamação local. Dessa forma, animais knockout para IL-18 ou submetidos à administração da proteína ligante de IL-18 (IL-18bp) antes do irinotecano têm a expressão de iNOS reduzida consideravelmente e com isso a diminuição da inflamação, dos danos estruturais em vilos e criptas, da diarreia e hipercontratilidade intestinal além da redução do número de células apoptóticas e vacuolização celular (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

Buscando padronizar um modelo experimental que utilizasse a combinação de irinotecano e 5-Fluorouracil, o que comumente ocorre na clínica, Pereira e colaboradores, após testarem algumas doses determinadas observaram que a associação de irinotecano na dose de 45 mg/kg e 5-FU na dose de 37,5 mg/kg foi a que melhor reproduziu a

mucosite intestinal no sétimo dia, com níveis de mortalidade aceitáveis, significativa diarreia, perda expressiva de massa corpórea, dano à mucosa intestinal, infiltração de neutrófilos, leucopenia e aumento de citocinas (TNF- α e IL-6) (PEREIRA *et al.*, 2016).

O tratamento com irinotecano, seguindo o mesmo protocolo de indução de mucosite utilizado em nosso estudo, também provocou alterações no perfil linfocitário ao longo dos dias de tratamento. A porcentagem de linfócitos T regulatórios (Tregs) e T helper 17 (Th17) aumentou com o passar do tempo e atingiu o ápice no sétimo dia após o início do tratamento com irinotecano. Além disso, ciclofosfamida, uma droga que tem a capacidade de depletar linfócitos Tregs, reduziu a sobrevivência dos animais e levou ao agravamento da perda de peso corporal, da diarreia e da infiltração de neutrófilos. A depleção desse subtipo linfocitário desencadeou a compensação pelo aumento na frequência de outros subtipos de células, com perfil pró-inflamatório (FERNANDES *et al.*, 2018).

Em um outro estudo, também se avaliou a possível participação dos linfócitos no desenvolvimento da mucosite induzida por irinotecano em camundongos utilizando-se Abatacept, um composto CTLA4-like, que atua inibindo a proliferação das subpopulações de linfócitos T. Os autores mostraram um efeito deletério do pré-tratamento com abatacept no curso da mucosite, com agravamento de praticamente todos os parâmetros avaliados, como infiltrado neutrofílico, diarreia, aumento do nível de KC e dano intestinal acentuado, ocasionando, como consequência desses fatores, redução da sobrevivência dos animais (NOBRE, 2017). Esses resultados, juntamente com o estudo anterior reforçam a ideia de que o equilíbrio entre a resposta pró- e anti-inflamatória parece ser importante na patogênese da mucosite intestinal.

Em estudo *in vitro*, observou-se que o metabólito ativo de irinotecano (SN-38) antagoniza a resposta de ativação de células RAW 264.7 por LPS (agonista de Toll-like 4), de forma concentração-dependente, e que maiores concentrações de LPS são capazes de abolir o efeito inibitório do irinotecano. De forma interessante, esse efeito não é observado quando se utiliza peptidoglicano, um agonista de receptores Toll-like 2 (TLR2). De forma semelhante, em modelo de bolsa de ar, SN-38 abole o efeito do LPS, levando à redução da migração de neutrófilos e dos níveis de TNF- α , IL-6, mas falha quando se utiliza zymosan (outro agonista para TLR2). Esses resultados mostram que o efeito inibitório desse metabólito sobre a inflamação aguda é exercido sobre a sinalização de TLR4, mas não TLR2 (WONG *et al.*, 2019).

A ativação de receptores Toll-like ativa a proteína adaptadora fator de diferenciação mieloide MyD88. Animais tratados com irinotecano 75 mg/kg têm elevada expressão de *MyD88*, *Tlr9*, *Il-1B*, *NF-κB* e *TRAF6*, e animais knockout para MyD88 e TLR2 apresentaram reduzido dano na mucosa intestinal, prevenção de diarreia, redução de translocação bacteriana e aumento da sobrevivência. Entretanto, a modulação genética para TLR9 não se mostrou benéfica, com redução na sobrevivência, diarreia acentuada e aumento na expressão de IL-18, diferindo significativamente do grupo tratado apenas com irinotecano (WONG *et al.*, 2015). Segundo Wong (2015), os patógenos, os padrões moleculares associados à patógenos e os padrões moleculares associados a danos (PAMPs e DAMPs) ativam receptores Toll-like dos tipos 2 e 9. A sinalização pós ativação desses receptores ocorre através da molécula adaptadora MyD88 e do fator 6 associado ao TNF (TRAF6), ativando o fator de transcrição NF-κB, o que leva à síntese de mediadores pró-inflamatórios. O recrutamento de neutrófilos e outras células inflamatórias por esses mediadores amplificam o dano à mucosa intestinal no contexto da mucosite. Além disso, Wong e colaboradores (2013) observaram que no quinto e sétimo dias após a primeira injeção de irinotecano, o número de bactérias na circulação sistêmica aumentou com relação ao grupo controle negativo (25 e 42,85%, respectivamente), além de detectarem crescimento de bactérias gram negativas *Escherichia coli*, *Citrobacter sp* e *Pseudomonas aeruginosa* no fígado e no linfonodo mesentérico (dados não publicados).

A microbiota intestinal em indivíduos saudáveis apresenta papel essencial na manutenção da homeostase intestinal, com efeitos protetores sobre a integridade epitelial. A interação destas bactérias com os receptores do tipo *Toll* e ativação da via de sinalização do fator de transcrição NFκB protegem a mucosa contra danos, promovendo reparo e regeneração celular (CARIO, 2008; STRINGER *et al.*, 2013; TOUCHEFEU *et al.*, 2014). Além disso, o muco produzido pelas células do epitélio intestinal, e a expressão e distribuição de proteínas de junção intercelular, importantes componentes da barreira intestinal contra patógenos, são outros fatores regulados por bactérias intestinais (CABALLERO-FRANCO *et al.*, 2007; ULLUWISHEWA *et al.*, 2011). Assim, uma perturbação na microbiota comensal pode desempenhar papel importante nas alterações de permeabilidade e contribuir para o quadro inflamatório presente na patogênese da mucosite intestinal.

Irinotecano reconhecidamente altera a microbiota do estômago, jejuno, cólon e fezes de ratos, contribuindo para a ocorrência de diarreia, infecção sistêmica e mucosite

intestinal (STRINGER *et al.*, 2007), porém, a profilaxia com antimicrobianos, usada para prevenir infecções sistêmicas em pacientes de alto risco não é recomendada pois ocasionaria tanto a depleção de microrganismos oportunistas quanto a redução de bactérias comensais (CARIO, 2016). Uma alternativa seria, então, a adição de moduladores da microbiota como probióticos, prebióticos ou paraprobióticos na rotina clínica.

1.4 Paraprobióticos

Com o objetivo de manter o equilíbrio da microbiota intestinal, a utilização de produtos que apresentam microrganismos como bactérias e algumas espécies de fungos na sua composição é uma estratégia efetiva e bastante difundida (ADAMS, 2010; DANTAS *et al.*, 2016). Nesse conjunto de produtos podemos encontrar probióticos, prebióticos, simbióticos, e mais recentemente paraprobióticos e pós-bióticos (Tabela 1).

Tabela 1. Probióticos, prebióticos, simbióticos, paraprobióticos e pós-bióticos: definições

Definição	
Probiótico	Organismos vivos que quando administrados na quantidade adequada promovem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).
Prebiótico	Ingredientes alimentares seletivamente fermentados que permitem alterações, tanto na composição como na atividade da microflora gastrointestinal, conferindo benefícios ao bem estar e saúde do hospedeiro". (ROBERFROID, 2007).
Simbiótico	Misturas de probióticos e prebióticos que afetam vantajosamente o hospedeiro, com efeito sinérgico, melhorando a sobrevivência e a implantação de microrganismos vivos no trato gastrointestinal do hospedeiro (ANDERSSON <i>et al.</i> , 2001).

Paraprobiótico	Células microbianas inviabilizadas por calor, altas pressões, radiação, sonicação, entre outros métodos, de modo a preservar a parede celular íntegra (DE ALMADA et al., 2016)
Pós-biótico	Metabólitos produzidos no processo de fermentação de componentes da dieta (fibras, polifenóis, carboidratos, proteínas e lipídios), assim como metabólitos secretados por bactérias da microbiota (PELUZIO; MARTINEZ; MILAGRO, 2021)

De acordo com a OMS, probióticos são organismos vivos que quando administrados na quantidade adequada promovem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). A aplicação dos probióticos se dá para alívio de eventos diarreicos, sintomas de intolerância à lactose, síndrome do intestino irritável, controle do colesterol e da pressão arterial, obesidade, e alguns tipos de câncer (ALMADA *et al.*, 2016). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, e algumas cepas de fungos *Saccharomyces* são comumente utilizados como probióticos (PARVEZ *et al.*, 2006; GUPTA & GARG, 2009), e 10^8 - 10^{11} UFC/dia é uma quantidade comprovadamente eficaz de probióticos a serem consumidos para que se obtenha os efeitos desejados (KHANI *et al.*, 2012).

O conhecimento atual, entretanto, nos permite afirmar que a viabilidade bacteriana não é exatamente necessária para que os efeitos dos probióticos sejam atingidos, e que nem todos os mecanismos e benefícios obtidos estão relacionados com o fato de o microrganismo estar viável (IMAOKA *et al.*, 2008; RAMPENGAN, MANOPPO, & WAROUW, 2010; VILLENA *et al.*, 2009). A esses microrganismos inativados deu-se o nome de paraprobióticos, termo usado para indicar o uso de células microbianas não-viáveis capazes de conferir benefícios à saúde daquele que os consome, representando uma nova categoria de agentes modificadores das respostas biológicas mais estáveis e seguros para aplicação em alimentos e produtos farmacêuticos, visto que sua viabilidade não é necessária nem durante a fabricação nem para a disponibilização a quem vai utilizá-lo (TAVERNITI & GUGLIELMETTI, 2011; BARROS *et al.*, 2020).

Atualmente, no entanto, o termo paraprobiótico vem sendo utilizado para referir-se apenas às células microbianas intactas inviabilizadas por diversos métodos, como calor, altas pressões, radiação, sonicação, entre outros, que promovem a morte bacteriana

sem alterar a parede celular (DE ALMADA et al., 2016), enquanto os fatores solúveis provenientes da lise bacteriana ou segregados por bactérias vivas são denominados pós-bióticos (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018; PELUZIO; MARTINEZ; MILAGRO, 2021). Os paraprobióticos promovem seus benefícios através de mecanismos como modulação do sistema imune através de componentes da parede celular das células bacterianas, adesão aumentada das células intestinais, resultando em inibição de migração de patógenos e de secreção de metabólitos pelas células mortas, e podem ser obtidos através da exposição a fatores que alteram a estrutura da célula, como submissão de cepas ao calor, altas pressões, radiação, sonicação, entre outros, sem perturbar a membrana bacteriana e a parede celular (ALMADA et al., 2016; AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

Paraprobióticos podem ser usados no tratamento de diarreia, colite, lesões intestinais, inflamação, dor visceral, além de modulação da microbiota intestinal, sistema imune e translocação bacteriana (ALMADA et al., 2016). Existem relatos na literatura abordando o efeito imunomodulatório de paraprobióticos *in vitro* e *in vivo*. O paraprobiótico *Lactobacillus gasseri* TMC0356, por exemplo, induz maior produção de IL-12 *in vitro*, que o seu respectivo probiótico. Essa citocina atua induzindo a produção de INF- γ por macrófagos, formando uma conexão entre imunidade inata e adaptativa (MIYAZAWA et al., 2011). *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius* e *L. gasseri* inativados por calor, estimulam a produção de IL-10, IL-12 e IFN- γ em células do baço, evidenciando uma alteração da resposta imune para o perfil Th1 (CHUANG et al., 2007). Corroborando com esse resultado, Ou e colaboradores deduziram que a imunomodulação promovida *in vitro* por bactérias ácido-láticas se dá pelo aumento do nível de citocinas associadas ao perfil Th1 e redução das citocinas de perfil Th2 (OU et al., 2011).

Ensaio clínico vêm sendo realizados para determinar a eficácia e segurança do uso de paraprobióticos. Sawada e colaboradores observaram que o paraprobiótico CP2305 de *Lactobacillus gasseri*, quando utilizado uma vez por dia durante 3 semanas possui efeito positivo na regulação da função intestinal em pacientes com tendência à constipação (SAWADA et al., 2016). O paraprobiótico MCC1849 (*Lactobacillus paracasei*), por sua vez, aumentou a resistência daqueles que o utilizaram diariamente ao desenvolvimento de resfriado comum (MURATA et al., 2018).

Poucos estudos em animais utilizando paraprobióticos foram realizados até a presente data. Seong e colaboradores avaliaram o efeito de *Lactobacillus casei* DKGF7

inativado pelo calor em ratos com síndrome do intestino irritável induzida por estresse. Os pesquisadores observaram que os animais que receberam o tratamento apresentaram uma melhora na consistência das fezes a partir da primeira semana de tratamento, mostraram redução nos níveis das citocinas IL-1 e TNF- α na quarta semana de tratamento e aumento na expressão das proteínas de junção claudina-1 e OZ-1, sugerindo que esse paraprobiótico pode servir como estratégia terapêutica para pacientes com síndrome do intestino irritável (SEONG *et al.*, 2021).

Os estudos que envolvem o uso de paraprobióticos são escassos, principalmente com foco na mucosite intestinal, sendo a maioria deles realizados utilizando probióticos. Trindade e colaboradores, no entanto, utilizaram paraprobiótico de *Lacticaseibacillus rhamnosus* em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos, e compararam os resultados obtidos com os resultados observados com o tratamento com probiótico de *L. rhamnosus*. O estudo mostra que ambos grupos pré-tratados com paraprobiótico ou probiótico apresentaram preservação na arquitetura do epitélio intestinal e redução na translocação bacteriana, mas somente o pré-tratamento com paraprobiótico foi capaz de reduzir a permeabilidade intestinal, a perda de peso dos animais, manter a produção de muco em níveis normais e aumentar a frequência de células T regulatórias (TRINDADE *et al.*, 2021).

Como dito anteriormente, a maioria dos estudos realizados com modelos de mucosite intestinal utilizam probióticos como pré-tratamento ou tratamento concomitante à indução de mucosite. A utilização de uma combinação de cepas de *Streptococcus thermophiles*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *Lactobacillus paracasei*, *L. acidophilus* e *L. plantarum*, por exemplo, reduziu a diarreia e perda de peso de ratos tratados com irinotecano, o que foi correlacionado com o aumento da proliferação de criptas intestinais e inibição de apoptose das células epiteliais intestinais (BOWEN *et al.*, 2007). Em outro estudo, Bastos e colaboradores (2016) demonstraram, em modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos, que o tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* protegeu os animais do dano intestinal, com redução da perda de peso, da permeabilidade intestinal e do encurtamento de vilosidades, além de reduzir o estresse oxidativo e estimular a recuperação do epitélio intestinal (BASTOS *et al.*, 2016). *Saccharomyces boulardii*, outra cepa comumente utilizada em probióticos, foi capaz de reduzir a perda de peso em animais com mucosite induzida por irinotecano devido à redução da severidade da diarreia observada (SEZER *et al.*, 2009). Na mucosite

induzida por 5-FU, o uso de leite fermentado com *Lactobacillus delbrueckii* ofertados *ad libitum* para camundongos 10 dias antes da indução de mucosite e seguindo até a eutanásia, reduziu a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1b, além de aumentar a expressão de IL-10, Muc2, e claudinas 1 e 2, com reversão do nível de expressão de Myd88 e TLR2 e TLR4 a níveis normais (BARROSO *et al.*, 2021). No estudo de Quintanilha e colaboradores (2022), os autores detectaram que o tratamento com probiótico ou paraprobiótico de *Bifidobacterium longum* começando no mesmo dia da primeira injeção de irinotecano em camundongos não reduziu a resposta inflamatória, enquanto o pré-tratamento durante 10 dias com o probiótico na dose de 1×10^9 UFC/mL protegeu do dano ao epitélio intestinal, reduziu a permeabilidade intestinal, resposta inflamatória e o dano oxidativo induzidos pelo irinotecano (QUINTANILHA *et al.*, 2022).

Redman e colaboradores observaram que probióticos reduzem a incidência, duração e severidade de diarreia relacionada à utilização de antibióticos e quimioterápicos em humanos, entretanto, não existem evidências suficientes para determinar a segurança da utilização destes em pacientes oncológicos (REDMAN, WARD & PHILLIPS, 2014). Apesar dos benefícios promovidos pela administração de microrganismos viáveis, estes podem ocasionalmente induzir efeitos adversos como bacteremia, sepse e endocardite em indivíduos imunossuprimidos, como os pacientes com câncer. Land e colaboradores (2004) por exemplo, relatam casos de indivíduos que apresentaram sepse e bacteremia que foram atribuídas a cepas de *Lactobacillus* ingeridas por estes em probióticos, e analisando molecularmente as cepas isoladas do sangue desses pacientes, os autores identificaram que estas eram idênticas às presentes no probiótico (LAND *et al.*, 2005). Devido à não comprovada segurança da utilização de probióticos em pacientes com câncer, no Reino Unido aconselha-se que pacientes neutropênicos não consumam produtos que contenham probióticos (BECKERSON *et al.*, 2012).

A partir desses dados, a utilização de paraprobióticos em animais submetidos ao nosso modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano pode ser uma alternativa mais segura e eficaz na modulação da microbiota intestinal e do sistema imune, do que o uso de probióticos, visto que estes últimos podem estar relacionados ao desenvolvimento de bacteremia e sepse em alguns pacientes imunossuprimidos, e no contexto da mucosite temos a perda da integridade do epitélio intestinal, que facilita a translocação bacteriana para a circulação sistêmica.

A escolha de um microrganismo para estudo e posterior aplicação como modulador da microbiota intestinal deve levar em consideração fatores como a sua não patogenicidade, capacidade de resistir ao peristaltismo, ser tolerante a ambientes ácidos e possuir capacidade de aderência ao epitélio intestinal (MACHADO *et al.*, 2014). Dentre os gêneros comumente utilizados temos *Enterococcus*, cujas cepas têm sido utilizadas como aditivos alimentares probióticos ou têm sido recomendadas como suplementos para o tratamento de disbiose intestinal e outras condições (KRAWCZYK *et al.*, 2021).

1.5 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus spp. são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, pertencentes ao grupo das bactérias ácido lácticas e que se encontram na microbiota intestinal em grande densidade no intestino delgado e grosso, sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as espécies mais comumente encontradas nos seres humanos (MACHADO *et al.*, 2014; KRAWCZYK *et al.*, 2021). *E. faecalis* é a primeira colonizadora do trato gastrointestinal humano, com grande impacto no desenvolvimento imunitário nas primeiras fases da vida, e papel protetor do cólon, inibindo agentes patogênicos, induzindo a expressão de IL-10 e reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8 (DE ALMEIDA; TADDEI; AMEDEI, 2018).

Probióticos de *E. faecium* e *E. faecalis* são utilizados no tratamento da diarreia, inibindo a proliferação de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* e *Shigella*, no tratamento da síndrome do intestino irritável, da diarreia induzida pelo tratamento com antimicrobianos, redução do colesterol sérico e regulação da resposta imune na sinusite e bronquite (FRANZ *et al.*, 2011).

Em um estudo com hamsters fêmeas naturalmente envelhecidas, a suplementação da dieta desses animais com *E. faecalis* T-110 inativado pelo calor modulou a imunidade intestinal e controlou a proliferação de *Clostridium perfringens* e *C. difficile*, duas espécies que comumente causam infecções intestinais que são um problema de saúde pública e estão associadas a uma considerável taxa de mortalidade em idosos. O uso de paraprobiótico de *E. faecalis* T-110 pode prevenir, então, disfunções imunitárias relacionadas ao envelhecimento e infecções intestinais em humanos idosos (INATOMI; OTOMARU, 2020).

Alguns estudos têm sido realizados utilizando cepas de probiótico ou paraprobiótico de *E. faecalis*. Em modelo experimental de colite induzida por Dextran

Sulfato de Sódio em camundongos, a administração de *E. faecalis* por gavagem, na dose de 17mg/kg começando uma semana antes da indução de colite reduziu a ativação de inflamassoma, a perda de peso dos animais e os escores de diarreia (CHUNG *et al.*, 2019). Matsumoto e colaboradores (2021), tratando porcos com probiótico de *E. faecalis* EC-12 na dose de 0,1% de EC-12 peso/peso, adicionado suplementando a dieta basal, observaram redução da abundância de *Enterobacteriaceae* no jejuno e no íleo dos animais, além de diminuir o escore de diarreia, suprimindo a diarreia induzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica (MATSUMOTO *et al.*, 2021).

Além de efeitos positivos na redução da diarreia e inflamação, *E. faecalis* EC-12 inativado por calor, na dose de 50 partes por milhão, administrado por gavagem durante 8 semanas em camundongos, suprime fracamente o desenvolvimento de pólipos intestinais que podem evoluir para câncer colorretal, e essa supressão se dá pela atenuação da via de sinalização da β -catenina (MIYAMOTO *et al.*, 2017).

Tais características de *E. faecalis* fazem dessa espécie uma boa escolha para utilização como probiótico, e estudos mostram que seus efeitos benéficos também são observados quando *E. faecalis* é inativado por calor, trazendo ainda mais segurança para utilização em pacientes imunossuprimidos pela terapia antineoplásica.

2. JUSTIFICATIVA

Partindo do conhecimento de que irinotecano provoca uma modificação na microbiota do trato gastrointestinal, e que isso contribui para o desenvolvimento de mucosite intestinal e que pode evoluir para uma infecção sistêmica, a modulação da microbiota intestinal com paraprobióticos apresenta-se como uma alternativa factível e segura para promover o equilíbrio desta e assim prevenir ou minimizar o desenvolvimento de mucosite. O paraprobiótico de *E. faecalis* tem potencial para ser incorporado como uma nova abordagem terapêutica na rotina clínica, contribuindo para a melhora da qualidade de vida dos pacientes. A maioria dos estudos que avaliam o efeito de paraprobióticos foram realizados *in vitro*, e nenhum estudo determinou a eficácia e segurança de paraprobiótico de *E. faecalis* em modelos animais de mucosite intestinal ou em pacientes com mucosite, sendo esse o objetivo desse estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do tratamento com paraprobótico de *E. faecalis* (EC-12) ou de uma formulação baseada em paraprobóticos de *Enterococcus* e *Bifidobacterium* (Med Lan-S) na mucosite intestinal induzida por irinotecano.

3.2 Específicos

- Verificar o efeito de tempos diferentes de tratamento com EC-12 ou Med Lan-S no desenvolvimento de mucosite;
- Determinar a dose adequada de paraprobóticos para ser utilizada como pré-tratamento no contexto da mucosite intestinal induzida por irinotecano;
- Analisar os parâmetros inflamatórios envolvidos no desenvolvimento da mucosite após tratamento com EC-12 e Med Lan-S;
- Avaliar a ocorrência de alterações nas proteínas de junção intercelular no epitélio intestinal dos animais com mucosite pré-tratados com paraprobótico;
- Realizar análise para avaliar presença de bacteremia nos animais dos dois protocolos;
- Analisar o efeito do pré-tratamento com paraprobóticos sobre a ativação de receptores do tipo Toll like 4.
- Analisar a intensidade de fluorescência para TLR4, F4/80 e IL-18BP após tratamento com irinotecano e comparar com animais pré-tratados com paraprobótico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os procedimentos em animais foram realizados após aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC, de acordo com os regulamentos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sob o número 4115280219. Utilizou-se camundongos C57BL/6 machos, com 6 a 8 semanas, pesando entre 18 e 24g, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, e n = 6 animais por grupo. Durante o período de adaptação e realização dos experimentos os animais permaneceram em um ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, exaustão de ar, ciclo de 12h claro/12h escuro controlados e com água e ração *ad libitum*.

4.2 Drogas

Cloridrato de irinotecano (ampolas com 100mg/5mL, Eurofarma); Cloridrato de dextrocetamina (Ketamin®, ampolas com 500mg/10mL, Cristália); Cloridrato de xilazina 2% (Ampola com 10 mL, Syntec).

4.3 Paraprobióticos

Foram utilizados no estudo o paraprobiótico EC-12[®] (*Enterococcus faecalis* pasteurizado, 5×10^9 UFC/g, Panel Japan Co. LTD., Tokyo, Japan) e Med Lan-S[®], uma preparação à base de paraprobiótico (*Enterococcus* e *Bifidobacterium* pasteurizados, dextrina, goma guar solúvel, xarope de maltose, suco de limão em pó, amido/ácido cítrico e açúcar stevia, Hayama Laboratory, Tokyo, Japan).

EC-12 e Med Lan-S foram pesados e diluídos em solução salina estéril (Solução fisiológica a 0,9%) em cada dia de tratamento, de acordo com a concentração de paraprobiótico desejada a ser administrada nos animais por gavagem.

4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano

Induziu-se mucosite de acordo com protocolo desenvolvido por Melo *et al.*, (2008). Os camundongos receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de solução salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.) ou Irinotecano (75 mg/kg, i.p.), administrados uma vez

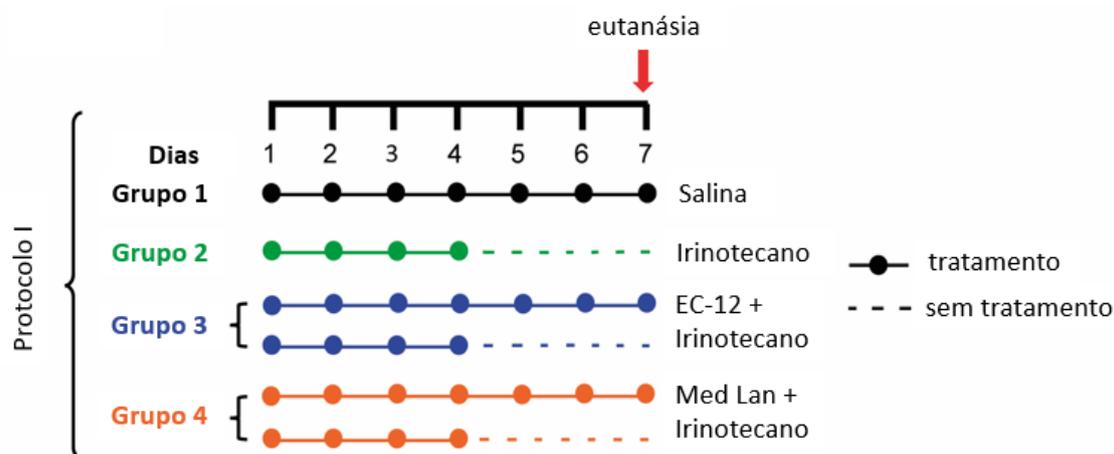
ao dia durante quatro dias consecutivos, realizando as aplicações sempre no mesmo horário. A eutanásia dos animais foi realizada no 7º dia experimental após a primeira aplicação do quimioterápico, dia em que se observa, no modelo experimental, a melhor reprodução do processo inflamatório observado nos pacientes (Melo *et al.*, 2008).

4.5 Protocolos experimentais

4.5.1 Protocolo I

Os animais foram divididos em grupos (n=6) e tratados conforme especificado adiante: **Grupo 1:** controle negativo injetado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo 2:** camundongos injetados com irinotecano (75 mg/kg/1x/dia/4 dias, i.p.); **Grupo 3:** camundongos tratados com EC-12 por gavagem desde o primeiro dia da injeção de irinotecano, continuando até o dia da eutanásia (EC-12 3×10^7 UFC/animal + Irinotecano 75 mg/kg/1x/dia/4 dias, i.p.); **Grupo 4:** camundongos tratados com Med Lan-S por gavagem a partir da primeira injeção de irinotecano, continuando até o dia da eutanásia (Med Lan-S 30×10^7 UFC/animal, 1x/dia, v.o. + Irinotecano 75 mg/kg/1x/dia/4 dias, i.p.).

Figura 3. Protocolo I



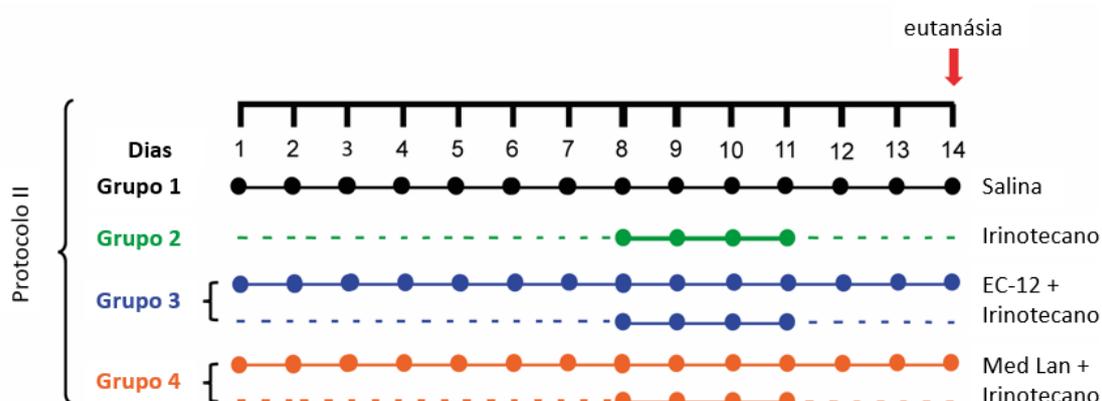
Fonte: própria autora

4.5.2 Protocolo II

Os animais foram tratados com salina, irinotecano ou pré-tratados com EC-12 ou Med Lan-S uma semana antes do primeiro dia de tratamento com irinotecano, de acordo com os grupos (n = 6): **Grupo 1:** controle negativo (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p. 1x/dia/14

dias); **Grupo 2:** camundongos injetados com irinotecano (75 mg/kg/1x/dia/4 dias, i.p., iniciando o tratamento no dia oito); **Grupo 3:** animais tratados com EC-12 por gavagem durante sete dias antes da primeira injeção de irinotecano, continuando até o dia da eutanásia (EC-12 3×10^7 UFC/animal, v.o. + Irinotecano 75 mg/kg/1x/dia/4 dias, i.p.) e **Grupo 4:** camundongos tratados com Med Lan-S por gavagem durante sete dias antes da primeira injeção de irinotecano, continuando até o dia da eutanásia (Med Lan-S 3×10^7 UFC/animal, 1x/dia, v.o. + Irinotecano 75 mg/kg/1x dia/4 dias, i.p.).

Figura 4. Protocolo II



Fonte: própria autora

4.6 Avaliação dos parâmetros gerais de indução da mucosite.

4.6.1 Avaliação Ponderal

Os animais foram pesados diariamente. A massa corporal foi mensurada em gramas e expressa, no gráfico, uma porcentagem da variação da massa corporal em relação ao primeiro dia experimental.

4.6.2 Contagem total de leucócitos

Os camundongos foram anestesiados usando uma injeção intramuscular de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para a coleta de sangue pelo plexo retro-orbital em condições assépticas imediatamente antes da eutanásia dos animais. Os animais

anestesiados foram então submetidos à exsanguinação através do corte da artéria carótida para a eutanásia. Uma amostra de 20 μL de sangue foi diluída em 380 μL de solução de Turk (Ácido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%). O número total de leucócitos plasmáticos foi determinado por contagem manual utilizando-se câmara de Neubauer. Os resultados da contagem das células contidas nos quatro quadrantes da câmara foram somados e o resultado multiplicado por 20, valor correspondente à diluição realizada, e depois por 10, fator de correção para determinar o número de células/ mm^3 .

4.6.3 Análise histopatológica e morfometria do intestino

Após a eutanásia dos animais, segmentos de 0,5 cm do íleo de cada animal foram removidos e lavados com solução salina para serem fixadas em formol tamponado a 10%. As amostras foram processadas e coradas com hematoxilina e eosina para exame com ampliação de 100 \times por microscopia ótica. Um patologista que não teve conhecimento dos tratamentos classificou a gravidade das alterações histopatológicas pelo sistema de pontuação proposto por Macpherson & Pfeiffer (MACPHERSON; PFEIFFER, 1978), descrito a seguir:

Tabela 2. Escores histopatológicos para análise de intestino delgado

Escore	Análise histopatológica
0	Ausência de lesão
1	Mucosa: achatamento de vilos e perda de arquitetura das criptas, escassa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema. Camada muscular: normal
2	Mucosa: achatamento de vilos com células entumescidas e com vacúolos, necrose das células da cripta, intensa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema. Camada muscular: normal
3	Mucosa: achatamento de vilos com células entumescidas e vacúolos, necrose da cripta, intensa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema. Camada muscular: edema, vacuolização e infiltração neutrofílica.

Fonte: Macpherson & Pfeiffer (1978).

Para a análise morfométrica, foi mensurado o comprimento das vilosidades, consideradas desde o ponto de encontro entre duas vilosidades até o topo destas (altura da vilosidade), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre duas vilosidades medidas até o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade

absortiva (razão altura dos vilos/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento dos vilos intestinais e a profundidade das criptas foi calculada em μm utilizando-se o software *ImageJ* versão 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA), sendo medidos 10 vilos e 10 criptas por corte histológico, em aumento de 100x.

4.7 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é comumente usada como um marcador da infiltração de neutrófilos nos tecidos inflamados. Neste estudo, a atividade da MPO foi medida nas amostras do íleo. resumidamente, cada amostra foi pesada e homogeneizada em um tampão frio de NaPO_4 0,02 M (pH 4,7) contendo NaCl 0,1 M e Na_2EDTA 0,015 M. Após a centrifugação, o precipitado foi processado com uma solução hipotônica (NaCl 0,2%) para lise celular e centrifugado. O pellet resultante foi ressuspensão em 300 μL de tampão NaPO_4 0,05 M, pH 5,4, contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB, Sigma-Aldrich/Merck Millipore, São Paulo, Brasil). A atividade da MPO foi determinada utilizando o reagente de cor que consiste de uma mistura 1:4 de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A reação foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (2M), e a absorvância foi analisada a 450 nm usando um espectrofotômetro. As leituras de absorvância foram plotadas em uma curva padrão de neutrófilos peritoneais de camundongos, como descrito por Dornelas-Filho et al (DORNELAS-FILHO *et al.*, 2018). Os resultados obtidos foram expressos como atividade de MPO (neutrófilos/mg de tecido).

4.8 Expressão de *Cldn-2*, *Ocln*, *Tlr4* e *Il-18* por RT-qPCR

O RNA total foi extraído usando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). O rendimento e a qualidade do RNA total foi obtido usando o equipamento Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A transcrição reversa do RNA foi realizada utilizando o kit iScript™ (Bio-Rad) e o termociclador Mastercycler (Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Os primers foram projetados com base em seqüências de ácidos nucleicos obtidos do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas, e as seqüências de primers são exibidas na **Tabela 3**. O RT-qPCR foi realizado no equipamento QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), utilizando o supermix iQ™ SYBR (Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A expressão de mRNA foi determinada após a normalização dos valores com o gene de referência *Gapdh*. Utilizamos o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a expressão relativa.

Tabela 3. Sequência de primers para RT-qPCR utilizados no estudo.

<i>Gene</i>	<i>Sequência</i>	
<i>Cldn-2</i>	Forward	5'- GGGCTGTTAGGCACATTCAT-3'
	Reverse	5'- TGATGCCTGTGCTGTGTGTC-3'
<i>Ocln</i>	Forward	5'- AAGAGCAGCCAAAGGCTTCC-3'
	Reverse	5'- CGTCGGGTTCCTCCATTA-3'
<i>Tlr4</i>	Forward	5'- TAGCCATTGCTGCCAACATC-3'
	Reverse	5'-CTGCCTCAGCAGGGACTTCT-3'
<i>Il-18</i>	Forward	5'-CAGGCCTGACATCTTCTGCAA-3'
	Reverse	5'-TCTGACATGGCAGCCATTGT-3'
<i>Gapdh</i>	Forward	5'- CTCAAGATTGTCAGCAATGC -3'
	Reverse	5'- CAGGATGCCCTTTAGTGGGC -3'

4.9 Imunofluorescência

As seções de íleo foram desparafinizadas por uma hora a 60°C. Os tecidos foram então reidratados em soluções alcoólicas e a recuperação de antígenos foi realizada em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0) em banho-maria a 95 °C por 15 minutos. Após a permeabilização da membrana nuclear com uma exposição de 10 minutos com solução 0,1% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), o bloqueio de ligações não específicas foi obtido usando glicina 0,3 M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) diluída em albumina de soro bovino a 5% (BSA) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos. Os tecidos foram incubados overnight a 2 - 8 °C com anticorpos primários

políclonais de cabra anti-TLR4 de camundongo, com diluição 1:200 (número de produto sc-16240, Santa Cruz Biotechnology Inc., EUA), TX, EUA) IL-18 binding protein (IL-18BP, a diluição 1:100, número de produto sc-9461, Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, EUA) ou F4/80 D2S9R XP® Rabbit mAb #70076 (Cell Signaling® Technology Inc., Danvers, MA, EUA) a diluição 1:300. Em seguida, as seções de tecido foram incubadas por 1,5 h com o anticorpo secundário IgG Alexa Fluor 594 (diluição 1:400, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para amostras de TLR4 ou IL-18BP, ou com IgG Alexa Fluor 568 (1:300, Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para amostras de F4/80. O núcleo foi corado com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA, 4 µL em 200 mL de PBS). Para a montagem das lâminas foi utilizado Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As imagens foram obtidas em um microscópio de varredura a laser (LSM 780, Zeiss®, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e a quantificação da área fluorescente foi realizada utilizando um software de imagem (Fiji ImageJ, National Institutes of Health, EUA). Para realizar a quantificação da área fluorescente nas fotomicrografias, foi necessário fazer a diferenciação dos pixels fluorescentes pela maior saturação de cor relacionada à fluorescência (vermelha). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem, que foi calculada tendo como referência a fluorescência do DAPI como sendo 100%.

4.10 Avaliação da bacteremia após a indução da mucosite intestinal

O sangue dos animais foi coletado via plexo retroorbital de maneira estéril e 100µL foi dispensado em 5mL de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). Os tubos permaneceram incubados a 37°C em estufa e o crescimento bacteriano foi avaliado através da turvação do caldo 24 e 48 horas após a incubação, e os resultados expressos como positivo (turvação do caldo) ou negativo (não turvação). Nas 48 horas após a incubação no caldo, 10 uL do caldo dos tubos que turvaram foi semeado em placa contendo meio ágar BHI e incubado novamente a 37°C, e o crescimento de bactérias foi avaliado 24 e 48 horas depois. O resultado da contagem de unidades formadoras de colônias foi expresso em Log UFC/mL

4.11 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para os escores, os dados são exibidos como mediana e intervalo. Após executar um teste de normalidade, os dados foram analisados usando One-way ANOVA e pós-teste Bonferroni, ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, conforme o caso. Os testes pós-hoc foram realizados após a ANOVA somente se F alcançou o nível de significância estatística ($P < 0,05$) e não houve variação significativa da não homogeneidade. A transformação de dados (log) só foi usada no ensaio de bacteremia para resolver a falta de significância e atender aos critérios acima. O nível de significância estatística foi fixado em 5% ($P < 0,05$). O software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) foi usado para análise.

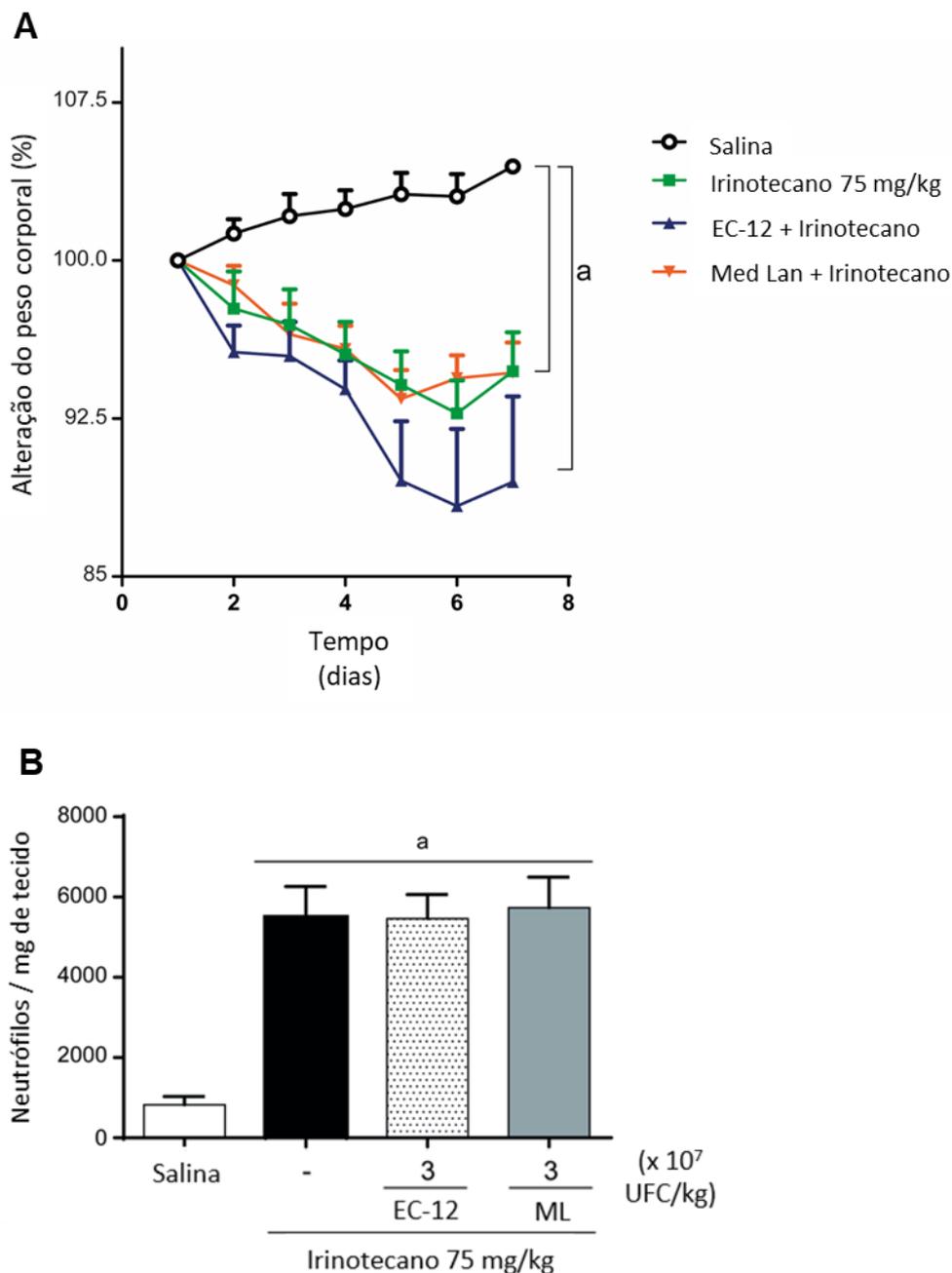
5. RESULTADOS

5.1 Protocolo I

Primeiramente os animais foram tratados com EC-12 ou Med Lan-S a partir do primeiro dia de indução de mucosite com irinotecano 75 mg/kg, e a eutanásia foi realizada no sétimo dia após o início do tratamento (dia 0). A indução da mucosite foi avaliada pelos parâmetros alteração da massa corporal, infiltração de neutrófilos no intestino e avaliação histopatológica e morfométrica do intestino.

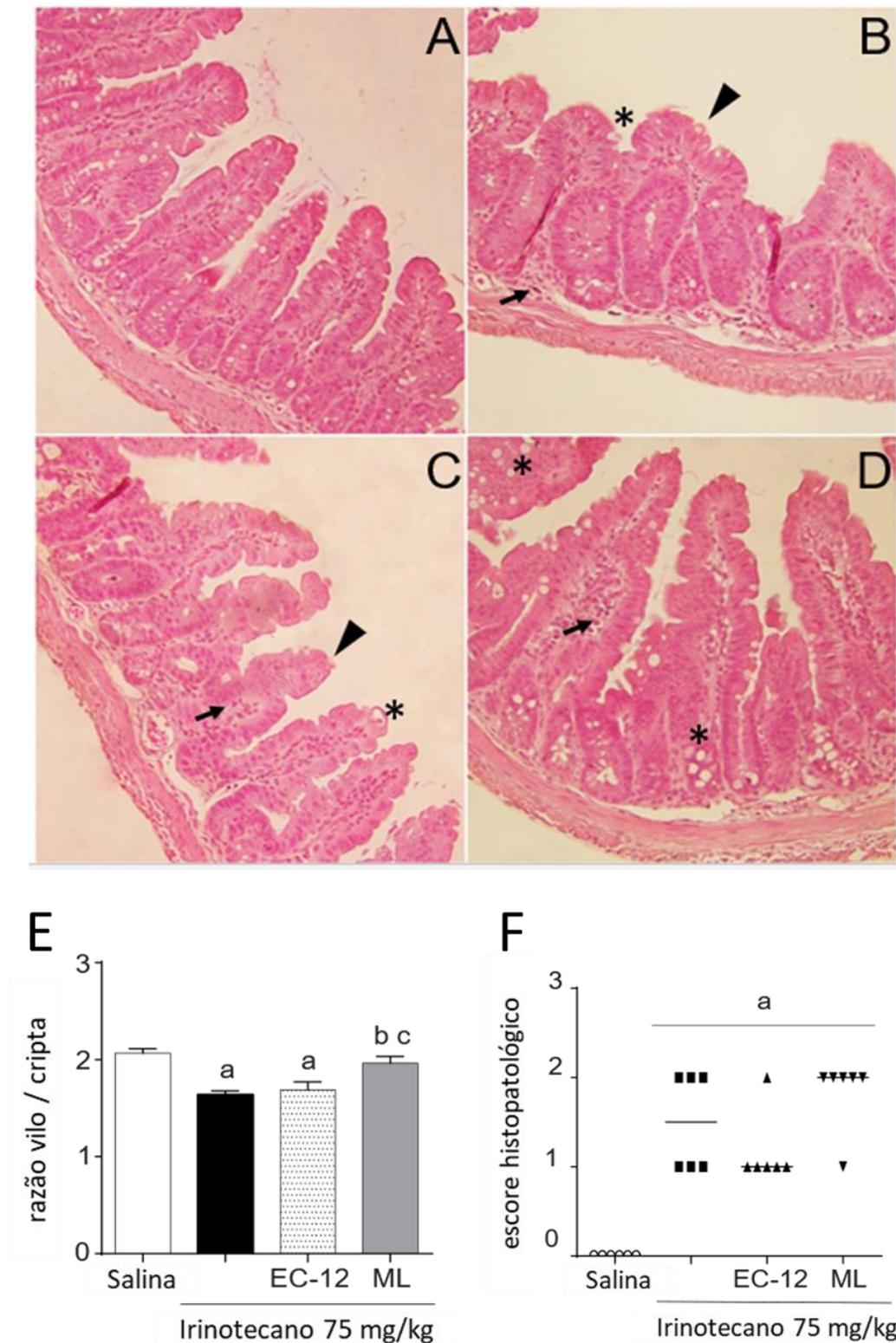
Como mostrado na **Figura 5A**, EC-12 e Med Lan-S não impediram a perda de massa corporal relacionada à quimioterapia ($P > 0,05$ em comparação com os animais tratados com irinotecano). A injeção de irinotecano induziu o acúmulo de neutrófilos no intestino versus o grupo salina ($P < 0,05$). Notavelmente, a administração de EC-12 ou Med Lan-S não conseguiu evitar a infiltração de células inflamatórias (**Figura 5B**). O dano intestinal induzido por irinotecano foi confirmado pela histopatologia ($P < 0,05$ vs. o grupo salina, **Figura 6 A-F**). Entretanto, o tratamento com EC-12 ou Med Lan-S não impediu as alterações, como detectado pelos escores histopatológicos (**Figura 6F**, $P > 0,05$ vs. o grupo irinotecano).

Figura 5. O tratamento por curto tempo com paraprobióticos não evita a perda de massa corporal ou a infiltração de neutrófilos.



Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o.) + irinotecano, ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o.) + irinotecano desde o primeiro dia de injeção de irinotecano. A eutanásia se deu no sétimo dia após o início do tratamento com o quimioterápico. (A) todos os grupos induzem maior perda de massa corpórea em função do tempo, versus grupo salina. EC-12 piora a perda de massa corpórea em relação ao grupo irinotecano. (B) Tanto o grupo irinotecano como os grupos tratados com EC-12 e Med Lan aumentaram o infiltrado em relação ao grupo injetado apenas com salina. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. ^b $p < 0,05$ vs grupo irinotecano. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do percentual de variação da massa corporal em relação ao peso inicial. Para a análise estatística utilizou-se o teste Two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni.

Figura 6. O tratamento com EC-12 ou Med Lan-S não conseguiu evitar os danos intestinais induzidos pelo irinotecano.



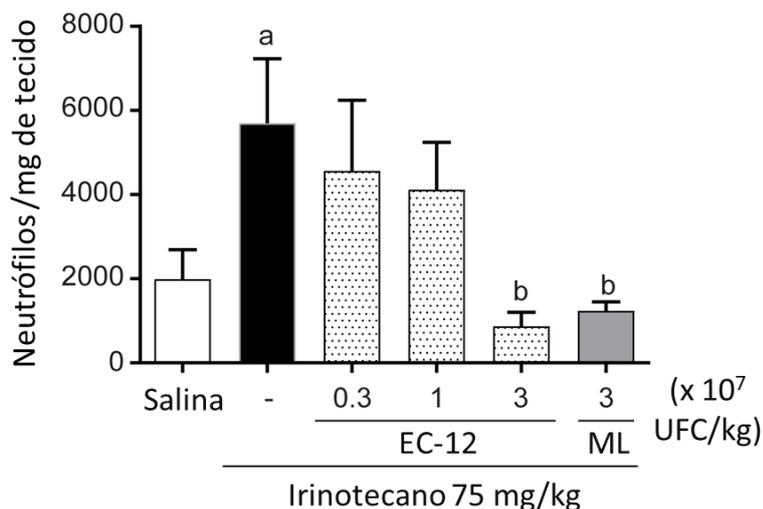
Os animais foram tratados como descrito no protocolo I. (A) salina, (B) irinotecano (75 mg/kg, i.p.), (C) EC-12 + irinotecano, (D) Med Lan-S (ML) + irinotecano. A morfometria intestinal (E) e os escores histopatológicos (F) indicam que o tratamento inicial dos animais com paraprobióticos iniciando simultaneamente com o irinotecano não protegem do dano intestinal. ^ap<0,05 vs salina; ^bp<0,05 vs EC-12;

^cp<0,05 vs o grupo irinotecano. As pontas de setas apontam o encurtamento das vilosidades; as setas indicam infiltração inflamatória; os asteriscos indicam as áreas com vacuolações celulares.

5.2 Protocolo II

Nesse segundo protocolo, realizamos um pré-tratamento com EC-12 e Med Lan-S durante 7 dias antes da primeira injeção de irinotecano, realizando a eutanásia no décimo quarto dia após a primeira administração deste. Primeiramente, para determinação e escolha da dose do paraprobiótico que apresentasse o melhor efeito sobre a mucosite, utilizamos três diferentes concentrações (0,3, 1 e 3×10^7 UFC/kg) do paraprobiótico de *Enterococcus faecalis* isolado (EC-12). A partir do ensaio de mieloperoxidase, observamos que EC-12 e Med Lan-S na concentração de 3×10^7 UFC/kg conseguiram reverter o nível de infiltrado neutrofílico para níveis semelhantes ao do grupo controle negativo, sendo por esse motivo a dose escolhida para os experimentos posteriores (Figura 7).

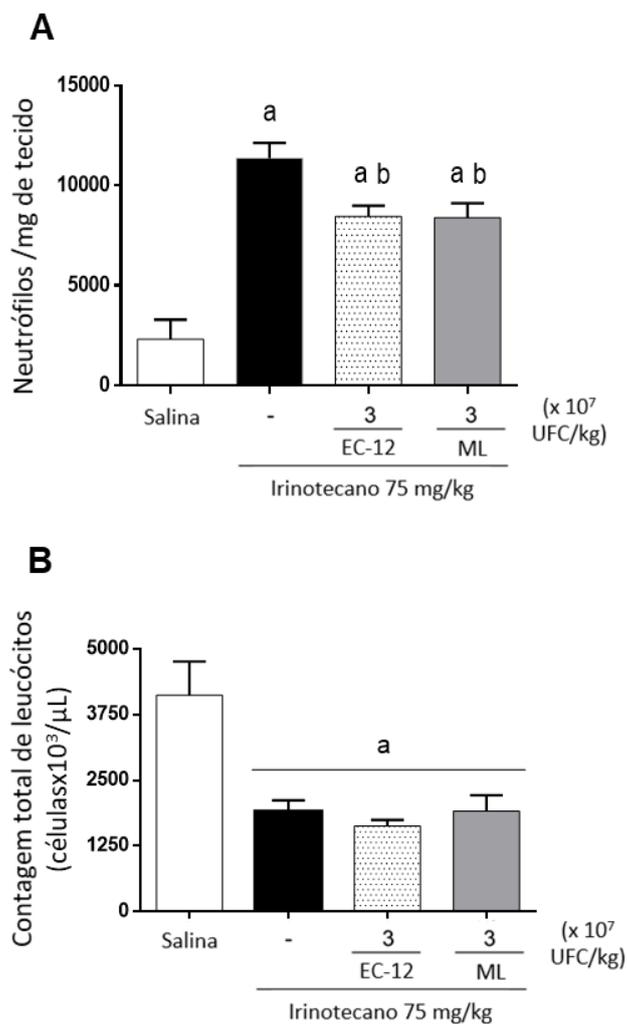
Figura 7. Efeito do pré-tratamento com EC-12 ou Med Lan-S sobre a infiltração de neutrófilos no íleo dos animais tratados com irinotecano 75 mg/kg.



Os animais foram tratados com: salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), EC-12 (nas doses de 0,3, 1 ou 3×10^7 UFC/kg v.o. 14 dias) + irinotecano, ou Med Lan-S (3×10^7 UFC/kg v.o.) + irinotecano. Após a eutanásia, amostras de íleo foram coletadas e o infiltrado neutrofílico determinado indiretamente através do ensaio de mieloperoxidase (MPO). O pré-tratamento com EC-12 ou Med Lan na dose de 3×10^7 UFC/kg reduziu significativamente o infiltrado neutrofílico em comparação ao grupo salina. ^ap<0,05 vs grupo salina. ^bp<0,05 vs grupo irinotecano. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido por Bonferroni.

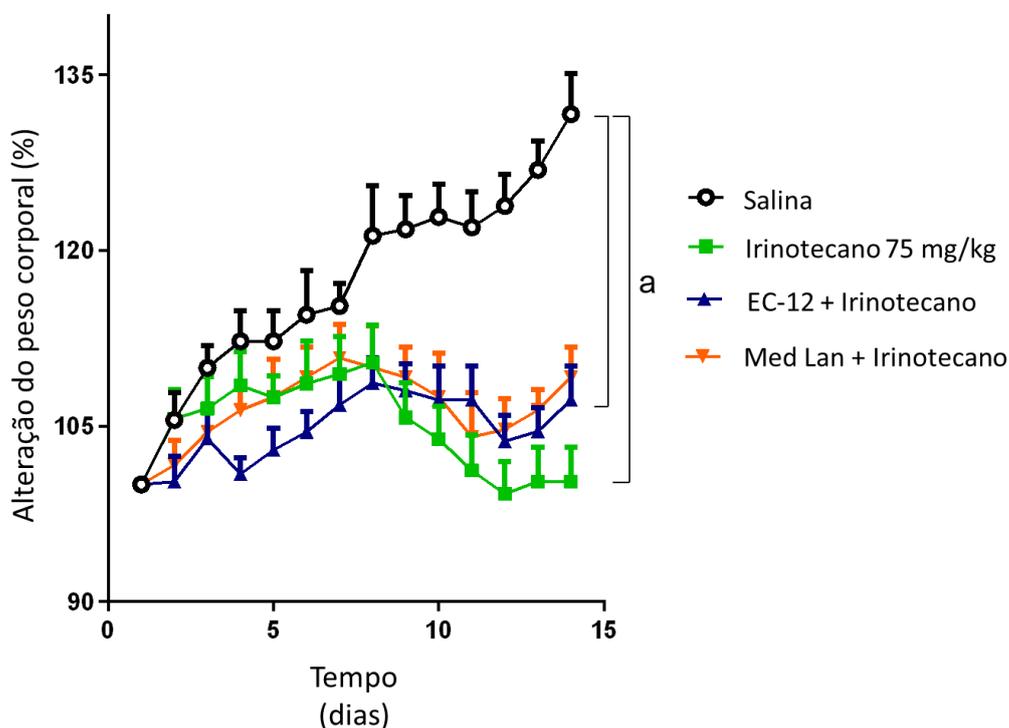
A injeção de irinotecano aumentou a infiltração de neutrófilos no intestino e a perda de massa corporal dos animais versus o grupo salina ($P < 0,05$, **Figura 8A e 9**, respectivamente), enquanto EC-12 reduziu a resposta inflamatória (**Figura 8A**, $P < 0,05$), mas não afetou a perda de massa corporal (**Figura 9**, $P > 0,05$) em comparação com o grupo irinotecano. Med Lan-S (3×10^7 UFC/kg) também mitigou a infiltração dos neutrófilos sem interferir na perda de massa corporal dos animais induzida por irinotecano (**Figura 8Ae 9**). Notavelmente, o efeito mielossupressor do irinotecano, como detectado pela contagem reduzida de leucócitos no sangue, não foi afetado pelo EC-12 ou por Med Lan-S (**Figura 8B**, $P > 0,05$).

Figura 8. Os paraprobióticos reduzem a infiltração de neutrófilos no intestino durante a mucosite e não afetam a mielotoxicidade associada ao irinotecano.



Os camundongos receberam EC-12 ou Med Lan-S (ML) na dose de 3×10^7 UFC/kg, começando uma semana antes do irinotecano até o dia da eutanásia. (A) O acúmulo de neutrófilos foi determinado pelo ensaio de mieloperoxidase (MPO). EC-12 e ML reduzem significativamente a infiltração de neutrófilos em comparação com o grupo irinotecano. (B) O número de leucócitos circulantes foi contado em uma câmara de Neubauer. Nenhum dos tratamentos interfere com a mielossupressão induzida pela irinotecano. ^a $p < 0,05$ vs. grupo salino. ^b $p < 0,05$ vs. grupo irinotecano.

Figura 9. Variação da massa corporal. A injeção de irinotecano causa perda de massa corporal, mas a administração de paraprobóticos não impede a variação da massa corporal.

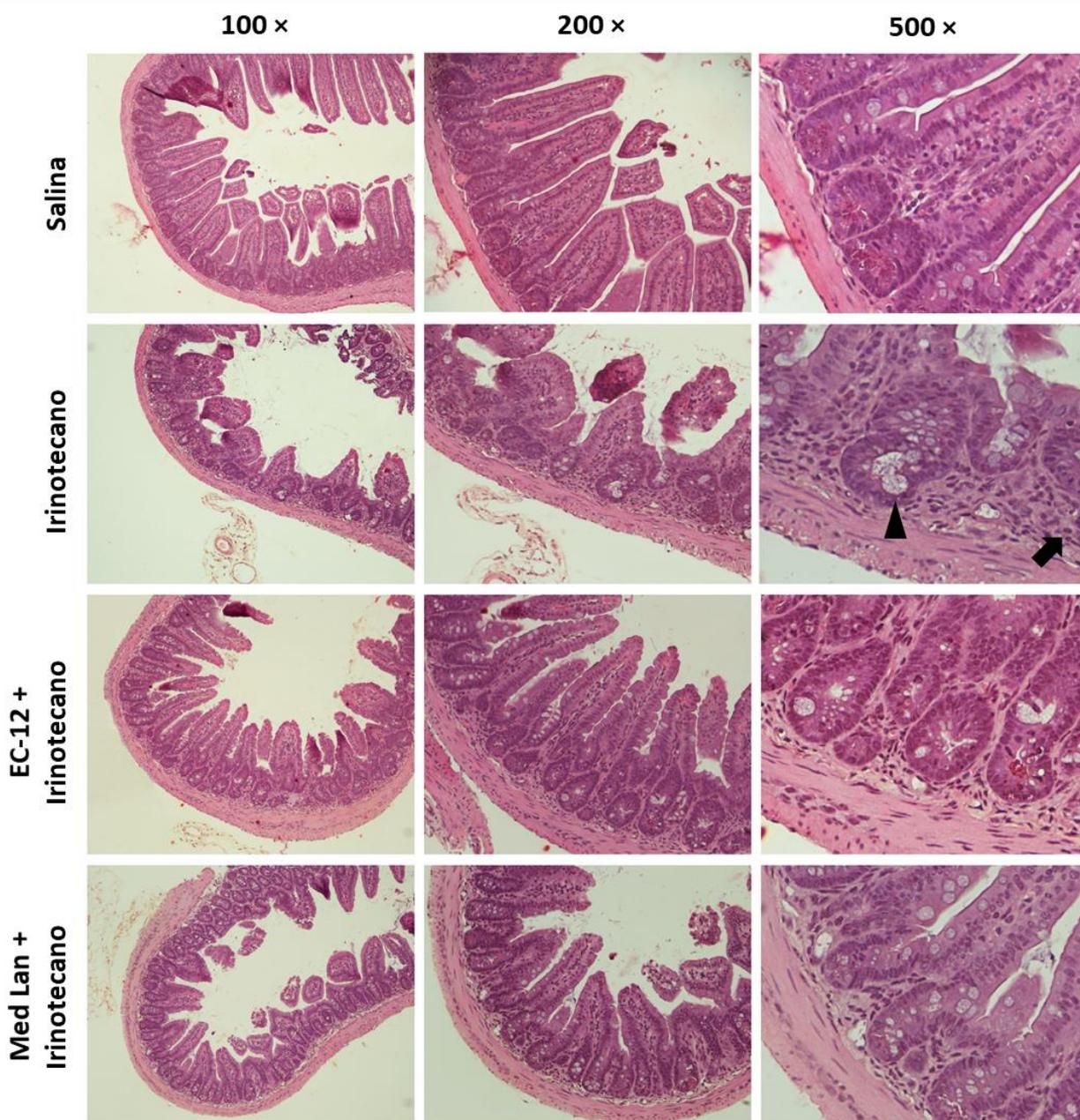


Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o. 14 dias) + irinotecano, ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o. 14 dias) + irinotecano. Todos os grupos induzem maior perda de massa corpórea em função do tempo, quando comparados aos animais tratados com salina. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do percentual de variação da massa corporal em relação ao peso inicial. Para a análise estatística utilizou-se o teste Two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni

Como podemos observar na **Figura 10**, irinotecano induziu danos intestinais pronunciados acompanhados de desorganização do revestimento celular epitelial, vacuolação celular, redução do comprimento dos vilos, aumento da profundidade das criptas e infiltração de leucócitos no íleo (escores histopatológicos 2[1-3]). Esses resultados contrastam ($P < 0,05$) com a arquitetura intestinal típica dos camundongos injetados com salina (escores histopatológicos 0[0-0]). Notavelmente, a administração de

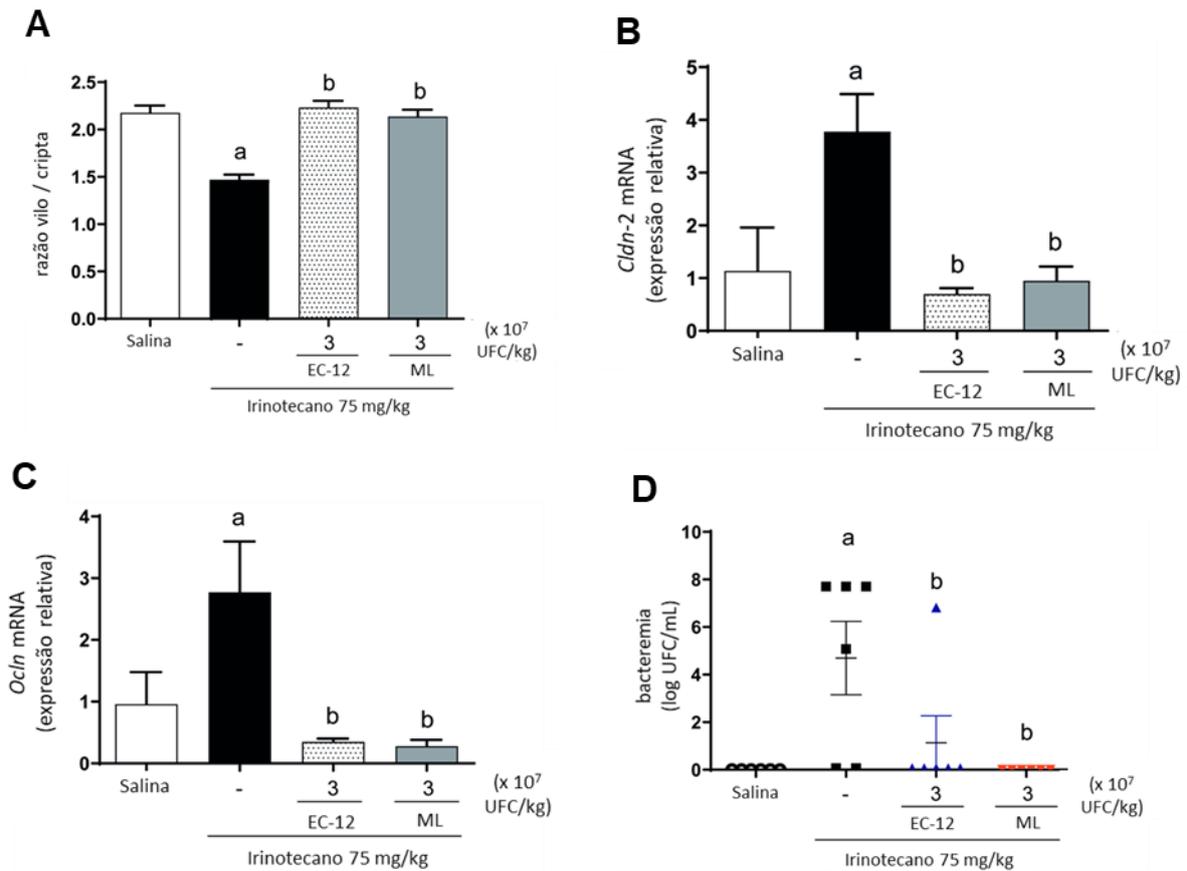
EC-12 (escores histopatológicos 1[1-1]) ou Med Lan-S (escores histopatológicos 1[0-2]) protegeram o intestino de lesões relacionadas ao irinotecano (**Figura 10**, $P < 0,05$ vs. o grupo irinotecano). A análise morfométrica do íleo (razão vilo/cripta, **Figura 12A**), a expressão de *Cldn-2* (**Figura 11B**) e *Ocln* (**Figura 11C**), e a avaliação da translocação bacteriana para o sangue (**Figura 11D**) confirmam tal proteção. A injeção de irinotecano reduziu a razão vilo/cripta (redução de 32%, **Figura 11A**), aumentou a expressão de *Cldn-2* (mais que o triplo, **Figura 11B**), e *Ocln* (mais que o dobro, **Figura 11C**), e induziu a translocação bacteriana ($4,7 \pm 1,5$ log UFC/mL, **Figura 11D**). Ao contrário, os grupos tratados com EC-12 ou Med Lan-S demonstraram uma razão vilo/cripta típica, expressão basal de *Cldn-2* e *Ocln*, e nenhuma bacteremia ($P < 0,05$ vs. o grupo irinotecano e $P > 0,05$ em comparação com os animais tratados com salina, **Figura 11A-D**).

Figura 10. O paraprobiótico evita danos histopatológicos.



Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias). A eutanásia foi feita no décimo quarto dia e amostras de íleo foram retiradas para processamento e coloração pelo método H&E. A ponta de seta indica vacuolação celular, e a seta aponta infiltração inflamatória em uma área de desorganização da cripta (aumentos de 100 \times , 200 \times , 500 \times).

Figura 11. EC-12 e Med Lan-S mantêm a integridade intestinal e previnem a bacteremia.

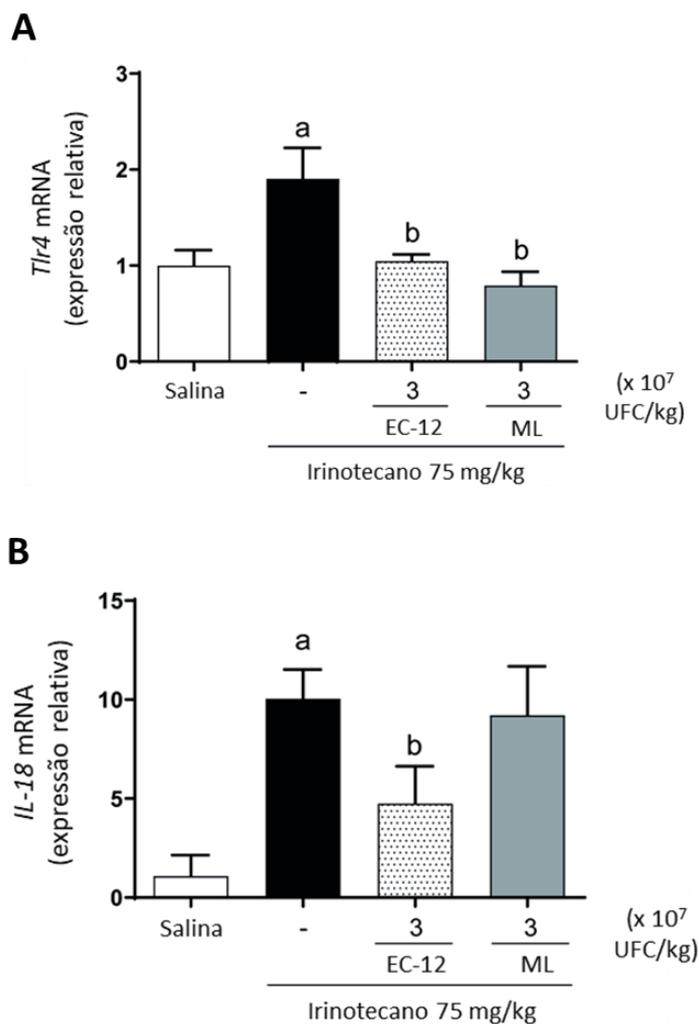


A administração de EC-12 ou Med Lan-S (ML) previne danos intestinais durante o tratamento com irinotecano, como observado em (A) a razão vilos/cripta, (B) expressão do mRNA de *Cldn-2* e (C) *Ocln*. (D) Amostras de sangue foram coletadas em condições estéreis para determinar a bacteremia. Irinotecano induz a translocação das bactérias para a corrente sanguínea, o que é prevenido por EC-12 e ML. Os valores são expressos como a média \pm EPM. ^a $p < 0,05$ vs. o grupo salina; ^b $p < 0,05$ vs. o grupo injetado com irinotecano.

Em seguida, testamos se a proteção do paraprobótico na mucosite induzida por irinotecano envolveria a modulação de TLR4, IL-18, IL-18BP e o acúmulo de macrófagos no intestino. Irinotecano aumentou a expressão de *Tlr4* e *Il-18* respectivamente em duas e dez vezes em comparação com o grupo salina (**Figura 12A e B**). Por outro lado, o tratamento dos animais com EC-12 reduziu a expressão destes dois genes ($P < 0,05$ vs. o grupo irinotecano, **Figura 12A e B**), mas Med Lan-S apenas atenuou a expressão de *Tlr4* ($P < 0,05$ vs. camundongos injetados com irinotecano), enquanto a expressão de *Il-18* permaneceu elevada ($P > 0,05$ vs. irinotecano, **Figura 12A e B**). Além disso, amostras de íleo do grupo irinotecano apresentaram aumento da fluorescência para o marcador de macrófagos F4/80 (5%, **Figura 13 e 16A**), TLR4 (28%, **Figura 14 e 16B**), e IL-18BP

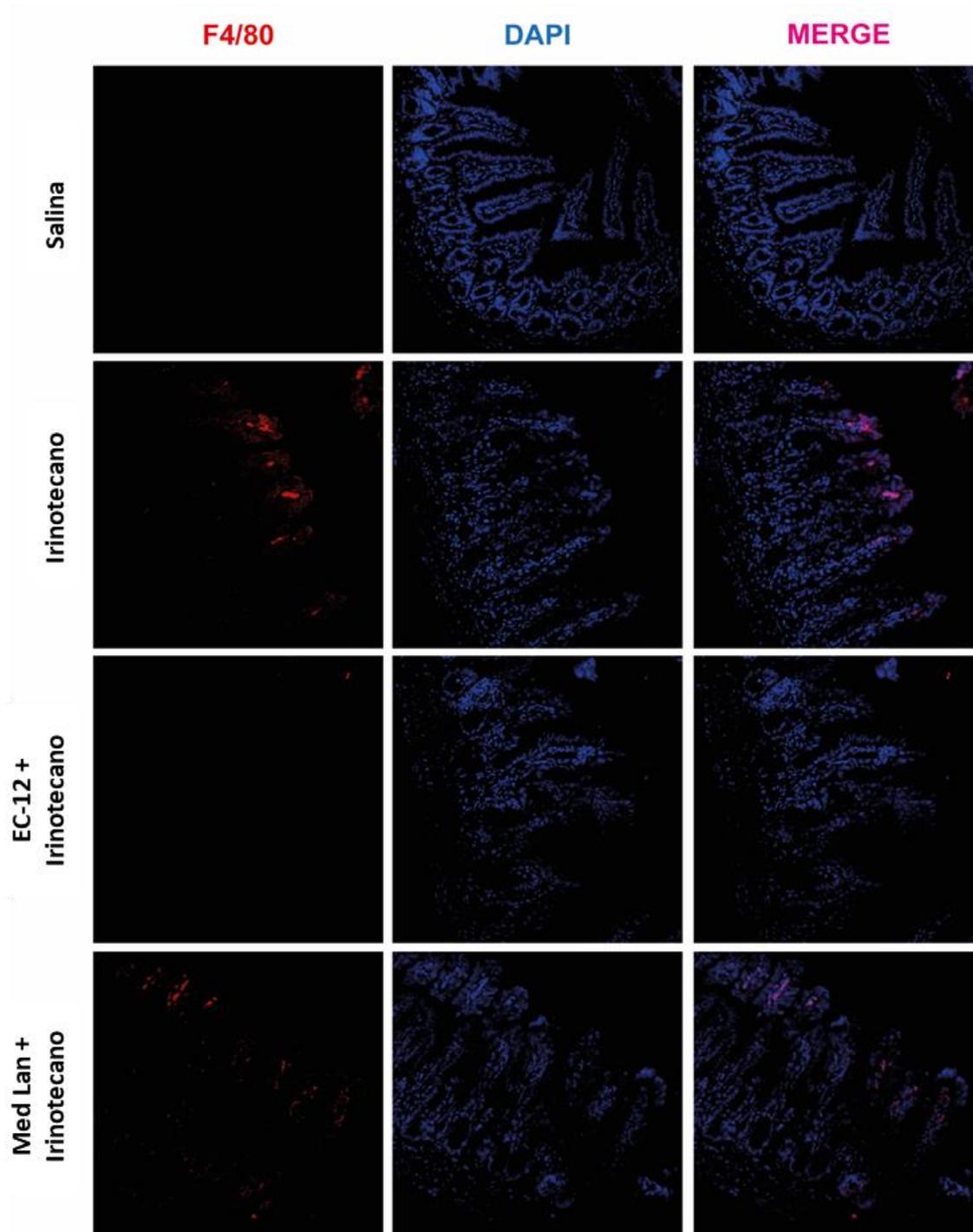
(26%, **Figura 15 e 16C**) em comparação com o grupo salina ($P < 0,05$, **Figura 13-16**). Além disso, as amostras obtidas de animais tratados com o paraprobiótico EC-12 apresentaram fluorescência reduzida para F4/80 (redução de 68%), TLR4 (redução de 71%), e IL-18BP (redução de 32%) em comparação com o grupo tratado apenas com irinotecano ($P < 0,05$, **Figura 13-16**). Em contraste, Med Lan-S não conseguiu reduzir o percentual de fluorescência para F4/80 (**Figura 13 e 16A**) e TLR4 (**Figura 14 e 16B**) em relação ao grupo irinotecano ($P > 0,05$), mas atenuou significativamente a expressão de IL-18BP (**Figuras 15 e 16C**, redução de 40% em relação ao grupo irinotecano).

Figura 12. Expressão do mRNA de *Tlr4* e *Il-18*.



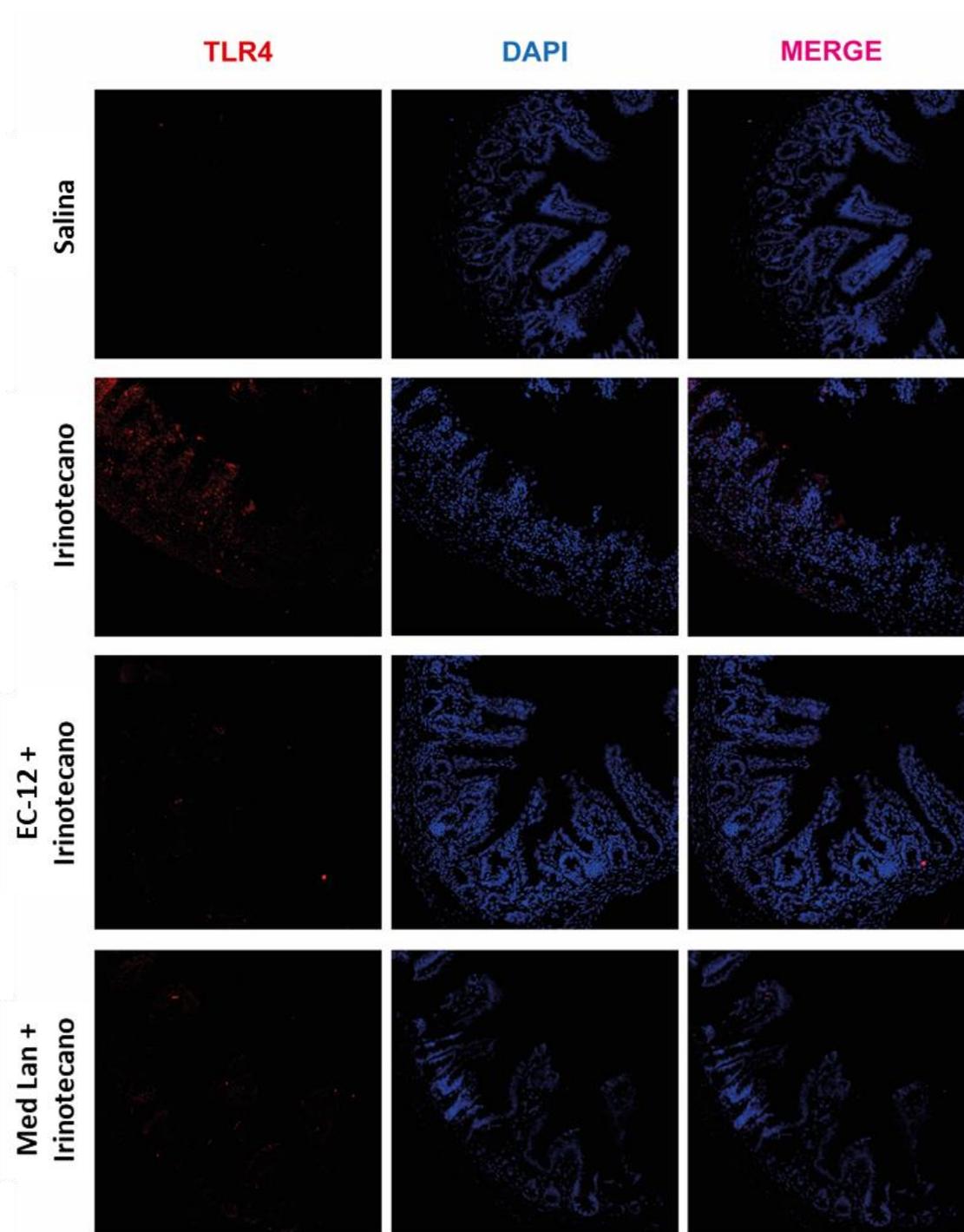
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/14 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano, ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano. Após a eutanásia, amostras de íleo foram retiradas para a realização de RT-qPCR. Irinotecano aumenta a expressão do mRNA de (A) *Tlr4* e (B) *Il-18*. O tratamento com EC-12 reduz significativamente a expressão dos dois marcadores inflamatórios em comparação com o grupo irinotecano (A e B). Entretanto, Med-Lan-S (ML) impede o aumento da expressão de *Tlr4* (A) mas não de *Il-18* (B). ^a $p < 0,05$ vs. grupo salina; ^b $p < 0,05$ vs. grupo injetado apenas com irinotecano. A análise estatística foi realizada por teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

Figura 13. Imunofluorescência para o marcador de macrófagos F4/80 no íleo.



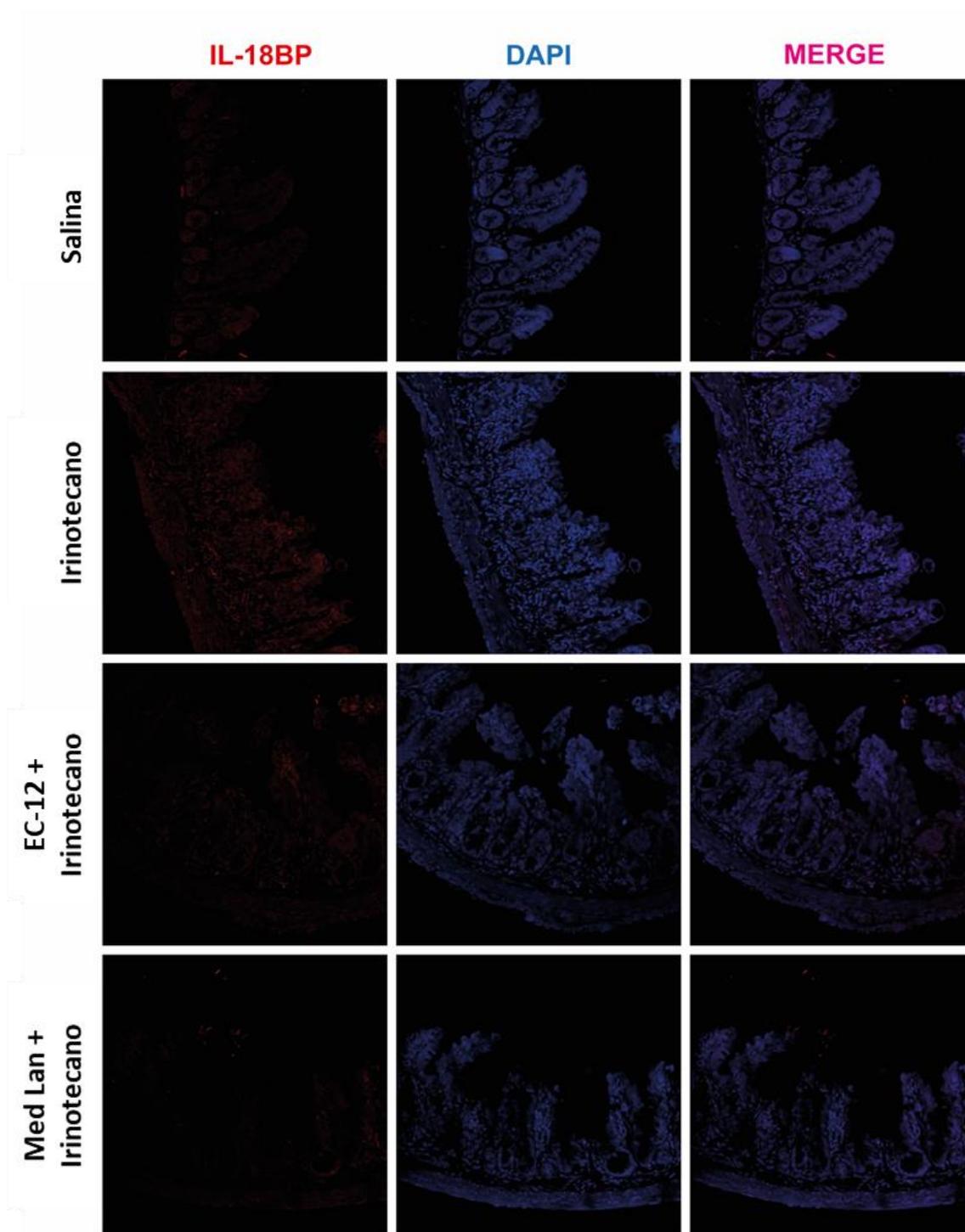
Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias). A eutanásia foi feita no décimo quarto dia e amostras de íleo foram retiradas e incluídas em parafina para realização de imunofluorescência. A injeção de irinotecano aumenta a fluorescência de F4/80 (vermelho), enquanto o tratamento com EC-12, mas não com Med Lan-S (ML), evita o acúmulo de macrófagos no intestino. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul) (Ampliação 200 \times).

Figura 14. Imunofluorescência para TLR4 no íleo.

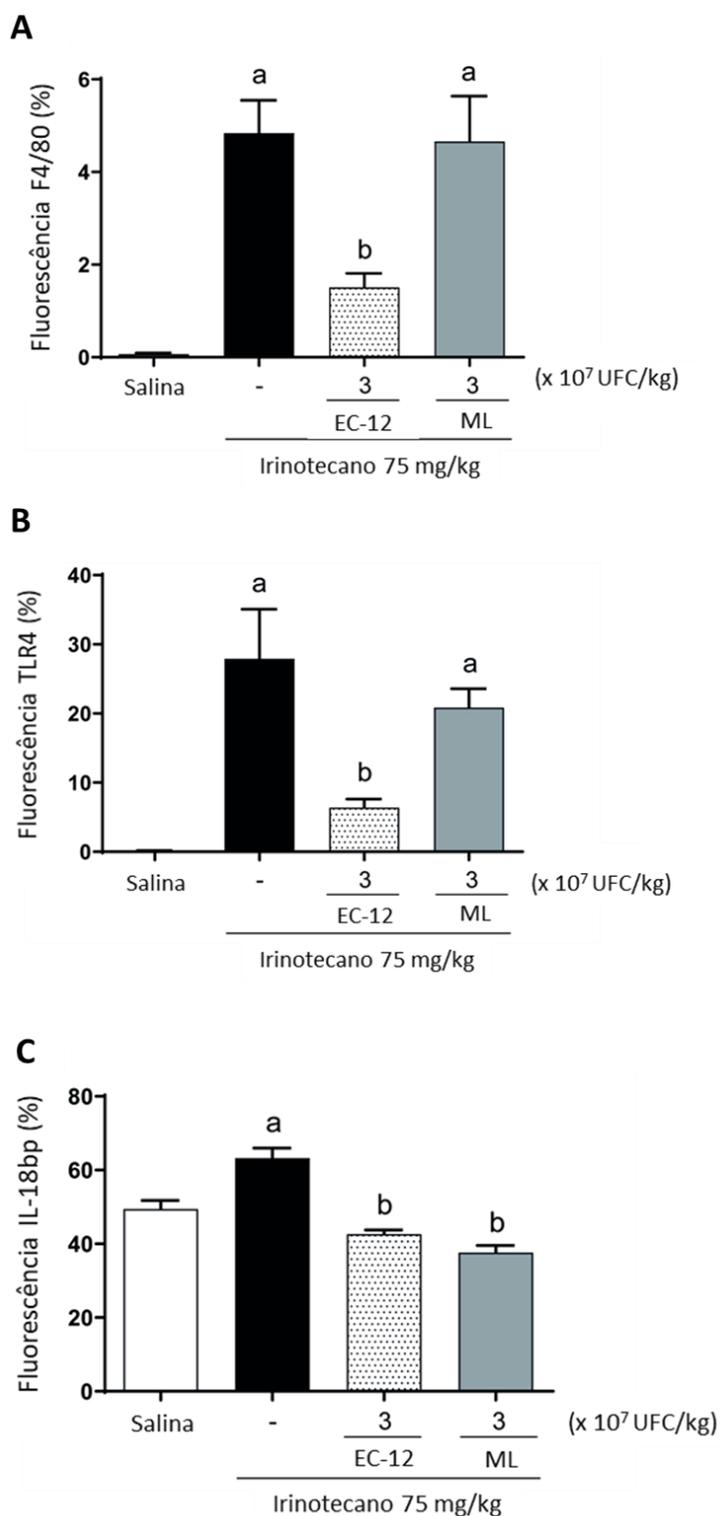


Os camundongos receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias). A eutanásia foi feita no décimo quarto dia e amostras de íleo foram retiradas e incluídas em parafina para realização de imunofluorescência. Animais injetados com irinotecano mostram aumento da fluorescência para TLR4 (vermelho) no íleo. Entretanto, o intestino dos camundongos que receberam EC-12 apresentam marcação reduzida de TLR4. Isto contrasta com os tecidos dos animais tratados com Med Lan-S (ML) que possuem significativa marcação para TLR4. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). (Ampliação 200 \times).

Figura 15. Imunofluorescência para a proteína de ligação de IL-18 (IL-18BP).



Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias). A eutanásia foi feita no décimo quarto dia e amostras de íleo foram retiradas e incluídas em parafina para realização de imunofluorescência. Intestinos de camundongos tratados com irinotecano mostraram marcação de IL-18BP (vermelho), enquanto nenhuma fluorescência é observada nas amostras obtidas de animais administrados com EC-12 e Med Lan-S. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul) (Ampliação 200 \times).

Figura 16. Quantificação da área fluorescente de F4/80, TLR4, e IL-18BP.

Os camundongos receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), EC-12 (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), ou Med Lan (3×10^7 UFC/kg v.o. 1xdia/14 dias) + irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias). A eutanásia foi feita no décimo quarto dia e amostras de íleo foram retiradas e incluídas em parafina para realização de imunofluorescência. ^a $p < 0,05$ vs. grupo salina; ^b $p < 0,05$ vs. grupo injetado somente com irinotecano.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos avaliar o efeito do tratamento com paraprobióticos no processo inflamatório característico da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos C57BL/6. Os resultados obtidos demonstram que o pré-tratamento com paraprobiótico de *Enterococcus faecalis* isolado (EC- 12) ou com formulação à base de *Enterococcus* e *Bifidobacterium* (Med Lan-S) levam à melhora em parâmetros inflamatórios e de dano intestinal no contexto da mucosite induzida por irinotecano.

Ao longo dos últimos 30 anos, devido à crescente incidência do câncer colorretal na população mundial e conseqüentemente da mucosite intestinal nos pacientes submetidos ao tratamento à base de 5-Fluorouracil e irinotecano, foram desenvolvidos modelos experimentais buscando reproduzir o observado na clínica, e desta forma elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese desse efeito colateral e auxiliar o desenvolvimento de alternativas terapêuticas que previnam ou melhorem a mucosite. No modelo de Ikuno *et al.* (1995), induziu-se mucosite intestinal pela administração de irinotecano na dose de 100mg/kg durante quatro dias consecutivos (GIBSON *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2008). O modelo de indução de mucosite intestinal utilizado no presente estudo foi padronizado por Melo e colaboradores (2008) e consiste em uma modificação do protocolo proposto por Ikuno e colaboradores (1995). Melo demonstrou que camundongos tratados com irinotecano na dose de 75 mg/kg, administrado via intraperitoneal durante quatro dias consecutivos apresentam o mesmo padrão de lesão, não importa o segmento. Considerando que a densidade bacteriana aumenta ao longo do trato gastrointestinal (SCHEITHAUER *et al.*, 2016) e bactérias são essenciais para o desenvolvimento da mucosite (RIBEIRO *et al.*, 2016), nós usamos o íleo para testar nossa hipótese.

Devido à escassez de estudos avaliando o efeito do uso de paraprobióticos sobre alguma condição, a dose utilizada nesse estudo teve como base estudos realizados com probióticos, os quais demonstram que a fim de que os efeitos benéficos desejados por esses compostos sejam alcançados, deve-se utilizar uma dose que varie entre 10^7 e 10^{10} UFC, sendo observado também que o efeito ou necessidade de maior ou menor concentração de probiótico varia com relação ao tipo de microrganismo em questão (OUWEHAND, 2017). Além disso, uma meta-análise de 64 estudos observou que a utilização de altas doses de probióticos (superiores a 10^{11}) não era eficaz para o tratamento

de doenças gastrointestinais, enquanto doses mais baixas foram eficazes (RITCHIE & ROMANUK, 2012).

O efeito modulador dos probióticos sobre a resposta imune, a microbiota intestinal e a integridade do epitélio intestinal é dependente do tempo de exposição a esses microrganismos. De fato, os resultados obtidos no nosso estudo mostram que a utilização tanto do paraprobiótico como do probiótico por via oral a partir do primeiro dia de tratamento com irinotecano não foi capaz de reduzir a inflamação local, enquanto o pré-tratamento diariamente durante sete dias antes da primeira injeção de irinotecano seguindo até o décimo quarto dia (dia da eutanásia) mostrou-se benéfico. Resultados semelhantes, realizando pré-tratamento por 7 dias foram observados em diferentes estudos. Em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em ratos, a utilização de *Bifidobacterium infantis* por via oral durante sete dias antes do antineoplásico levou ao aumento da altura dos vilos do jejuno, redução da expressão de NF- κ B e da concentração de IL-1, TNF- α e MPO (YUAN *et al.*, 2015). Meng e colaboradores demonstraram que a utilização dos probióticos VSL#3 e *Saccharomyces boulardii* por 7 dias antes da indução de colite por dextran sulfato de sódio foi capaz de melhorar a microbiota intestinal previamente alterada pela indução de colite em ratos (MENG *et al.*, 2019).

A utilização de probióticos tem se mostrado benéfica na redução da perda de peso em animais. Em um modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em ratos, Bowen *et al.* (2007), utilizando-se do probiótico VSL#3, uma mistura de quatro cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*), três de bifidobactérias (*Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium breve*) e uma cepa de estreptococo (*Streptococcus salivarius* subespécie *thermophilus*) mostraram que o tratamento com esse probiótico na dose de 3×10^8 por 21 e 28 dias no total foi capaz de reduzir consideravelmente a perda de massa corpórea característica da mucosite. Esse efeito benéfico pode estar relacionado com o tipo de bactéria, com o tempo de pré-tratamento ou mesmo com a necessidade de a bactéria apresentar-se viável. Em outro estudo também com probióticos, mas desta vez utilizando *Enterococcus faecalis* como no nosso caso, e mesmo período de tratamento utilizado no presente estudo (14 dias, via oral), a perda de peso também foi significativamente reduzida em animais com colite induzida por dextran sulfato de sódio, em relação ao grupo controle positivo (CHEN *et al.*, 2009). Em modelo de mucosite intestinal, desta vez induzida por 5-fluorouracil, o tratamento de camundongos durante três dias com uma mistura de duas (*Lactobacillus*

acidophilus e *Bifidobacterium lactis*) ou quatro cepas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, e *Bifidobacterium lactis*) reduziu os níveis de MDA, MPO, TNF- α e IL-6, além de aumentar a razão vilo-cripta, em relação ao grupo que recebeu apenas o quimioterápico, porém com relação à manutenção do peso dos animais, apenas a mistura de 4 cepas de probióticos, na concentração de 1×10^9 para cada cepa, foi capaz de promover efeito benéfico, em comparação ao grupo 5-fluorouracil (QUARESMA, *et al.*, 2020). Nem o EC-12 nem Med Lan-S impediram a perda de massa corporal e a leucopenia relacionadas ao irinotecano. Estes parâmetros servem como indicações razoáveis de se uma determinada droga teste interfere no efeito antiproliferativo da quimioterapia. (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

Assim como o presente estudo, outros pesquisadores observaram a redução do nível de infiltrado neutrofílico através do pré-tratamento durante 7 dias com probiótico em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU (YUAN *et al.*, 2015). Li e colaboradores (2009), por sua vez, testaram a possível diferença entre a utilização de *Lactobacillus rhamnosus* GG viável (probiótico) ou inativado pelo calor (paraprobiótico) na inflamação intestinal induzida por LPS em filhotes recém-nascidos de rato. Os resultados do estudo inferem que tanto o probiótico como o paraprobiótico reduziram os níveis de citocinas pró-inflamatórias e da quimiocina CINC-1 no fígado e no plasma desses animais (LI *et al.*, 2009)

É reconhecido que não só irinotecano, mas praticamente qualquer quimioterápico que cause toxicidade no trato gastrointestinal leva à uma alteração na integridade da barreira intestinal associada às proteínas de junção intercelular claudina, ocludina e zônula-occludens-1 (ZO-1) (WARDILL *et al.*, 2012). No estudo de Wardill e colaboradores, a indução de mucosite intestinal em camundongos pela injeção de uma única dose de 270 mg/kg desse fármaco ocasiona uma massiva internalização de claudina-1 24 horas após a administração de irinotecano, principalmente no íleo, além de proteólise de ZO-1 e ocludina no cólon e no íleo. Entretanto, de forma contrária ao nosso estudo, não houve alteração na expressão do mRNA dessas proteínas (WARDILL *et al.*, 2016). Curiosamente, verificamos o aumento da expressão do mRNA de claudina-2 e ocludina, possivelmente como resposta homeostática para recuperar o revestimento epitelial intestinal danificado durante o tratamento quimioterápico. Os níveis basais das proteínas de junção intercelular nos grupos que receberam paraprobióticos podem então indicar que os paraprobióticos mantêm a integridade das junções intercelulares.

Conjuntamente ao dano intestinal, irinotecano causa translocação bacteriana que pode ser estratificada em três níveis: **local**, quando as bactérias atingem os linfonodos mesentéricos; **regional**, quando as bactérias se localizam no sangue portal e no fígado; e **sistêmico**, indicando a presença de bactérias no sangue periférico e no baço (WONG *et al.*, 2015). Nossos resultados indicam que o irinotecano induziu uma translocação bacteriana sistêmica associada à severidade da mucosite. A bacteremia sistêmica aqui investigada simula uma condição séptica que os pacientes com câncer podem experimentar no tratamento, como um evento adverso grave que ameaça a vida. Considerando que o EC-12 e Med Lan-S impediram o desenvolvimento de bacteremia sistêmica, o significado clínico de tal descoberta apoia ainda mais os benefícios dos paraprobióticos.

Segundo a OMS e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o uso de probióticos pode causar quatro tipos de efeitos colaterais: infecções sistêmicas, atividades metabólicas prejudiciais, transferência de genes e estimulação imune excessiva em indivíduos suscetíveis (DORON; SNYDMAN, 2015). Relatos de casos clínicos de complicações associadas a probióticos envolvem indivíduos imunocomprometidos tratados principalmente com probióticos do gênero *Lactobacillus* e consistem em bacteremia (MEINI *et al.*, 2015) e endocardite (PASALA *et al.*, 2020). Uma razão para usar paraprobióticos ao invés de probióticos em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia é a possível maior segurança da utilização dos primeiros em pacientes imunossuprimidos. Notavelmente, tal proteção sobre a barreira intestinal encontrada no presente estudo também explica a redução da bacteremia e corrobora para a implementação dos paraprobióticos como uma estratégia terapêutica alternativa para gerenciar as toxicidades associadas à quimioterapia, reduzindo o risco dos pacientes.

Paraprobióticos e probióticos exibem um efeito modulador da resposta inflamatória que parece depender do tempo de exposição a esses compostos, da espécie de microrganismo utilizado e do modelo de inflamação crônica ou aguda. Em alguns estudos os resultados corresponderam ao observado no nosso, com relação à redução da expressão de interleucina-18. Em um estudo realizado *in vitro*, a exposição de células de adenocarcinoma colorretal humano Caco-2 a um coquetel pró-inflamatório composto por TNF- α , IFN- γ e IL-1 β por 24 horas levou à produção de mediadores inflamatórios como IL-6, IL-8 e IL-18, e a concentração de IL-18 e IL-6 foi consideravelmente reduzida por meio do pré-tratamento das células Caco-2 com os paraprobiótico de *L. rhamnosus GG*

ou *B. animalis subsp. lactis* inativados pelo calor ou a combinação de ambos. O pré-tratamento por 24 horas com esses paraprobióticos também reduziu a concentração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), mas não afetou os níveis de IL-8 e SICAM-1 (CASTRO-HERRERA *et al.*, 2020). Em outro estudo *in vitro*, o pré-tratamento de células de epitélio endometrial bovinas com *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 na concentração de 4×10^7 por poço antes de estímulo com *Escherichia coli* limitou a resposta inflamatória MyD88-dependente, reduzindo a expressão do mRNA de IL-1 β , IL-18, IL-8, IL-6, IL10 e TNF- α , que haviam aumentado pela estimulação com *E. coli*, além de reduzir o número de células apoptóticas (LIU *et al.*, 2016). A interleucina-18 possui um papel chave na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano. Lima-Júnior e colaboradores observaram que animais knockout para IL-18 ou tratados com uma proteína ligante de IL-18 (bpIL-18) uma hora antes da injeção de irinotecano 60 mg/kg por 4 dias apresentaram redução no grau de diarreia, preservação da arquitetura de vilos e criptas intestinais, redução da atividade de MPO e iNOS (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

Sabe-se que os receptores Toll-like apresentam um papel de extrema importância no contexto da mucosite intestinal induzida por irinotecano, através de sua ativação por PAMPs e DAMPs, culminando na ativação de diversos mediadores inflamatórios, dentre eles IL-18. Animais knockout para receptores Toll-like 2 e para a proteína MyD88, envolvida na via de sinalização dos receptores Toll, apresentam aumento de sobrevivência, redução da translocação bacteriana, além de prevenção ao dano intestinal e da diarreia (WONG *et al.*, 2015). Além disso, no processo de desenvolvimento da mucosite associada ao irinotecano, há acúmulo de macrófagos na mucosa (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014). Nossos achados corroboram com o observado por Lima-Júnior (2014) e indicam que o EC-12 reduziu as expressões de *Tlr4* e *Il-18*, o que pode estar correlacionado com a presença reduzida de macrófagos na lâmina própria. Vale ressaltar que, em um modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU, a administração de *Saccharomyces boulardii* reduziu a expressão de receptores toll-like dos tipos 2 e 4, da proteína adaptadora MyD88, e do fator NF- κ B no intestino de ratos tratados com este probiótico (JUSTINO *et al.*, 2020). Por outro lado, Med Lan-S forneceu proteção intestinal, que não foi acompanhada pela redução da expressão de *Tlr4*, *Il-18*, ou macrófagos.

IL-18BP é um antagonista da citocina pró-inflamatória IL-18. Ela forma um complexo com a IL-18, impedindo a ativação de receptores de membrana e o desenvolvimento de doenças. (DINARELLO *et al.*, 2013). Curiosamente, detectamos por

imunofluorescência que a IL-18BP é altamente expressa no intestino durante a mucosite. Além disso, o pré-tratamento de camundongos com EC-12 e com Med Lan-S impediu o aumento da fluorescência de IL-18BP. Um estudo anterior indicou que a IL-18 total e a IL-18BP são elevadas em pacientes com sepse no momento da admissão. Entretanto, a maioria da IL-18BP está ligada à IL-18, inibindo sua função pró-inflamatória. (NOVICK *et al.*, 2001). Em nosso estudo, o aumento dos níveis de IL-18BP no grupo irinotecano pode indicar um mecanismo de compensação para diminuir a resposta inflamatória durante a mucosite. Notavelmente, a falta de dano ao tecido nos grupos EC-12 e Med Lan-S, aliados aos baixos níveis de IL-18BP, sugerem que a produção de IL-18 é prejudicada pelos paraprobióticos e reforçam sua eficácia na proteção do intestino contra as lesões causadas pela quimioterapia.

Estudos anteriores indicam que probióticos ou paraprobióticos modificam a frequência das células mononucleares (ZHUO *et al.*, 2019). O uso de *Lactobacillus acidophilus* lisados em um modelo animal de câncer colorretal induzido por azoximetano e dextran sulfato de sódio aumentou a eficácia do tratamento com anticorpos anti-CTLA-4, que foi associado à redução de macrófagos do tipo M2, mas não do fenótipo M1 (ZHUO *et al.*, 2019). O efeito sobre o perfil macrofágico e a resposta imune parece ser influenciado pelo tipo de cepa utilizada e pelo modelo inflamatório. A formulação paraprobiótica utilizada em nosso estudo é baseada em *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e outros ingredientes que juntos podem regular positivamente mecanismos de resposta imunológica diferentes daqueles obtidos a partir de uma única e pura cepa bacteriana morta.

A maioria dos estudos que testam a eficácia de probióticos, prebióticos e paraprobióticos concentra-se em organismos/compostos purificados. Decidimos então testar se uma formulação baseada em *Enterococcus* e *Bifidobacterium* (Med Lan-S) seria tão benéfica quanto o paraprobiótico composto apenas por *E. faecalis* inativado (EC-12) no controle do conjunto de sintomas característicos da mucosite. Tanto EC-12 como Med Lan-S protegeram os camundongos da mucosite, através de mecanismos diferentes. Apesar dos resultados positivos do presente estudo, a complexidade da formulação de Med Lan-S pode ter desencadeado um mecanismo de proteção imunológica inato. Ao mesmo tempo, EC-12 protegeu o intestino de danos relacionados à quimioterapia, reduzindo amplamente a ativação de respostas inflamatórias.

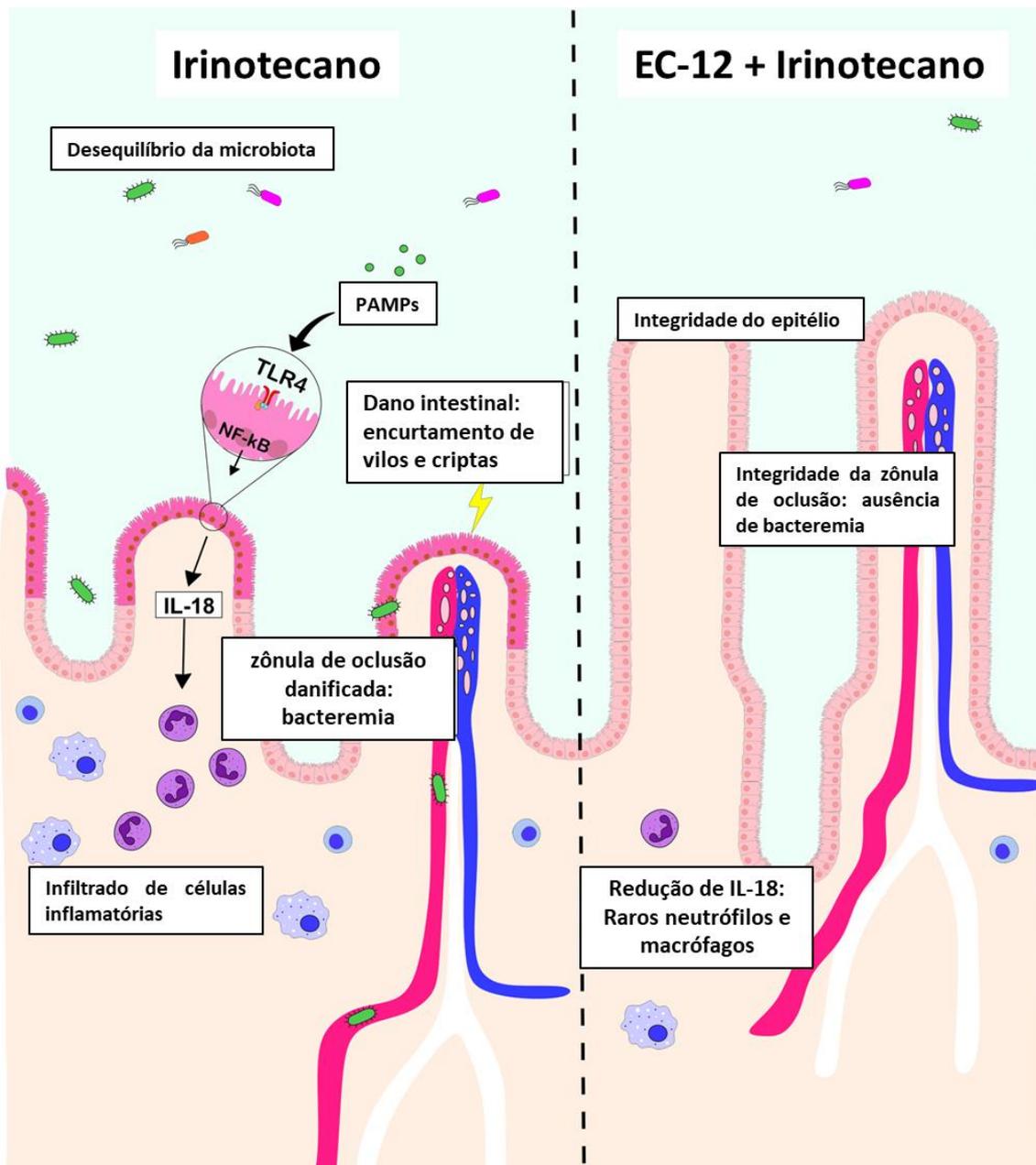
Embora não haja tratamento curativo para a mucosite induzida por irinotecano, a literatura sugere efeitos protetores de remédios fitoterápicos (CECHINEL-ZANCHETT *et al.*, 2019; DE ALENCAR *et al.*, 2017) ou inibidores da beta-glucuronidase (BHATT *et al.*, 2020). Apesar dos promissores avanços terapêuticos dessas estratégias, algumas preocupações surgem. Por exemplo, a beta-glucuronidase bacteriana intestinal é uma enzima que reconhecidamente afeta o metabolismo do irinotecano. O pró-fármaco irinotecano é convertido ao metabólito ativo SN38 no fígado. A adição subsequente de ácido glucurônico para formar o SN38-G inativo favorece sua eliminação através do trato gastrointestinal. Uma vez no lúmen intestinal, a beta-glucuronidase bacteriana remove a porção de glucuronideo do SN38-G, reativando esse metabólito, que é reabsorvido e dessa forma tem a sua meia-vida aumentada, porém a mucosite se desenvolve como consequência desse processo. Ter como alvo as beta-glucuronidasas, portanto, apresenta uma limitação por interferir na eficácia antitumoral do irinotecano. A intensificação da dose de irinotecano é proposta para a redução da atividade antitumoral (BHATT *et al.*, 2020), mas pode-se esperar uma mielototoxicidade potencialmente aumentada. O presente estudo contribui sugerindo, ainda, mecanismos alternativos de modulação da mucosite associada à quimioterapia.

A preparação adequada das formulações deve considerar o tipo de insumos em sua composição. O uso e escolha corretos de formulações para a entrega adequada de tais microrganismos são essenciais para a obtenção dos benefícios à saúde, normalizando a microbiota disbiótica e reduzindo a patologia intestinal em curso. Este estudo reforça que a modulação da microbiota intestinal com paraprobióticos afeta diretamente o padrão da resposta imunológica. Notavelmente, a administração de *E. faecalis* inativado pelo calor reduziu a resposta pró-inflamatória deletéria prevenindo a lesão intestinal associada ao irinotecano. Med Lan-S, por outro lado, possivelmente preparou células residentes para aumentar o mecanismo de vigilância para melhor responder ao insulto da quimioterapia, contrariando o desenvolvimento da mucosite. O tecido linfóide associado ao intestino pode estar envolvido, mas é necessária uma maior investigação. Apesar do mecanismo, a ativação adequada do sistema imunológico é altamente desejável para controlar as manifestações gastrointestinais da quimioterapia do câncer. Os paraprobióticos se apresentam então como estratégias terapêuticas viáveis.

7. CONCLUSÃO

Como conclusões do estudo, verificamos que para que os benefícios do uso de EC-12 e Med Lan-S sejam alcançados, é necessário que se realize um pré-tratamento de uma semana antes do início da indução de mucosite intestinal por irinotecano. EC-12 e Med Lan-S provavelmente previne contra a perda da integridade do epitélio intestinal, com manutenção das proteínas de junção intercelular claudina-2 e ocludina e consequente ausência de bacteremia. A utilização de paraprobiótico composto por *E. faecalis* inativado promoveu também redução da inflamação intestinal, com modulação da resposta das células inflamatórias residentes, e a expressão reduzida do mRNA de *Tlr4* e *IL-18* por EC-12, mas não por Med Lan-S, é correlacionada com a redução da marcação para macrófagos no íleo dos animais. Os resultados diferentes obtidos através do tratamento com Med Lan-S, que apresenta na sua fórmula não só *Enterococcus* e *Bifidobacterium* pasteurizados, mas também outros insumos, denotam a participação intensa das células da resposta imune inata e indicam que a composição da formulação à base de bactérias pode determinar efeitos diferentes na forma de modulação da imunidade.

A **figura 17** traz um resumo dos resultados observados no nosso estudo. Resumidamente, o tratamento com irinotecano na dose de 75mg/kg cursa com desequilíbrio na microbiota intestinal além de extenso dano ao epitélio levando ao encurtamento de vilos e desarranjo na arquitetura das criptas. O dano ao epitélio abrange também as proteínas da zônula de adesão intercelular, o que propicia a migração de bactérias para a circulação sanguínea. Além disso, receptores do tipo Toll-like reconhecem Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e Padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que levam à ativação do fator de transcrição NF- κ B, ativando a síntese de proteínas pró-inflamatórias como IL-18, induzindo a migração de células inflamatórias, que potencializam o dano. O pré-tratamento com paraprobiótico de *Enterococcus faecalis* EC-12 sete dias antes da indução de mucosite por irinotecano, continuando até o dia da eutanásia, mantém a integridade do epitélio do íleo, com provável manutenção da estrutura da zônula de adesão, o que impede a passagem de bactérias para a corrente sanguínea. O paraprobiótico também reduz a expressão de IL-18, reduzindo o número de neutrófilos e macrófagos que migram para o tecido, minimizando a inflamação local (**Figura 17**).

Figura 17. Resumo gráfico

Fonte: Própria autora.

8. ANEXO – Artigo publicado referente aos resultados da tese

Life Sciences 296 (2022) 120445



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifeisci

Paraprobiotic *Enterococcus faecalis* EC-12 prevents the development of irinotecan-induced intestinal mucositis in mice

Lívia Maria Soares Nobre^a, Marina Helena da Silva Lopes^b, Juliana Geraix^a, Aurilene Gomes Cajado^a, Jussara Matyelle Rodrigues Silva^a, Lyanna Rodrigues Ribeiro^a, Rosemayre Souza Freire^c, Diane Isabelle Magno Cavalcante^b, Deysi Viviana Tenazoa Wong^a, Ana Paula Negreiros Nunes Alves^d, Roberto César Pereira Lima-Júnior^{a,*}

^a Laboratory of Inflammation and Cancer Pharmacology, Drug Research and Development Center (NPDM), Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Graduate Program in Pathology, Department of Pathology and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Analytical Center Facility, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Paraprobiotic
Enterococcus faecalis
EC-12
Irinotecan
Intestine
Mucositis

ABSTRACT

Aims: This study tested the protective effect of purified paraprobiotic *Enterococcus faecalis* (EC-12) and an *E. faecalis*-based formulation (Med Lan-S) on irinotecan-induced intestinal mucositis murine model.

Main methods: C57BL/6 male mice received saline, irinotecan (75 mg/Kg, i.p.), EC-12 (0.3, 1, or 3×10^7 CFU/Kg, p.o.) + irinotecan or Med Lan-S (3×10^7 CFU/Kg, p.o.) + irinotecan. Body mass variation was assessed daily, and blood samples were collected for evaluating bacteremia and leukocyte count. The ileum was harvested for myeloperoxidase assay, histopathology, quantitative PCR, and immunofluorescence for macrophages (F4/80), TLR4, and IL-18 binding protein (IL-18BP).

Key findings: The best therapeutic strategy was EC-12 administration at 3×10^7 CFU/Kg, starting 1 week before irinotecan. EC-12 and Med Lan-S did not prevent the irinotecan-induced body mass loss or leukopenia but attenuated the neutrophil infiltration in the intestine and increased the villus/crypt ratio ($P < 0.05$). Additionally, EC-12 and Med Lan-S reduced the mRNA expression of *Ccln-2*, *Ocln*, and *Tb4* versus the irinotecan group ($P < 0.05$). Irinotecan also augmented the expression of *Il-18*, *Il-18BP*, the immunofluorescence of F4/80, and TLR4, while only EC-12 prevented the expression of all these markers. Remarkably, EC-12 and Med Lan inhibited the irinotecan-induced bacterial translocation to the blood.

Significance: Paraprobiotic *E. faecalis* EC-12 prevents the development of intestinal mucositis by downregulating the inflammatory response. Med Lan-S also protects from mucositis. Possibly, the complexity of the formulation accounts for an innate immune-driven protective mechanism.

1. Introduction

Intestinal mucositis is a toxicity associated with several anticancer chemotherapeutic drugs, including irinotecan [1]. It is characterized by mucosal ulceration, which triggers the migration of intestinal bacteria into the systemic circulation and increases the risk of sepsis [2]. Diarrhea is a common manifestation of intestinal mucositis due to an imbalance between electrolyte absorption and secretion [3–5]. About 50 to 100% of patients may be affected by this side effect, which reduces

the patients' quality of life and halts treatment progression, increasing the need for hospitalization and occasionally leading to death [6,7]. Currently, there is no curative treatment for intestinal mucositis, and its clinical management is limited to pain relief and the use of loperamide to control diarrheal events [8,9].

The pathogenesis of irinotecan-induced mucositis involves the modulation of toll-like receptors-2, -4, and -9 [10,11]. These receptors signal to activate the synthesis of proinflammatory mediators, such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-33, and nitric oxide, whose role in the

* Corresponding author at: Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Cel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, 60430-270 Fortaleza, Ceará, Brazil.

E-mail address: robertocesar@ufc.br (R.C.P. Lima-Júnior).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120445>

Received 27 November 2021; Received in revised form 17 February 2022; Accepted 26 February 2022

Available online 2 March 2022

0024-3205/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

9. REFERÊNCIAS

ABIGERGES, D.; CHABOT, G.G.; ARMAND, J.P.; HÉRAIT, P.; GOUYETTE, A.; GANDIA, D. Phase I and pharmacologic studies of the camptothecin analog irinotecan administered every 3 weeks in cancer patients. **J Clin Oncol.** v. 13(1), p. 210-21, 1995.

ADAMS, C.A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. **Nutr Res Rev.** v. 23(1), p. 37-46, 2010.

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; GARCIA-VARELA, R.; GARCIA, H. S.; MATA-HARO, V.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 105-114, 2018.

ALVES-FILHO, J.C.; DE FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F.Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit. Care Med.** v. 34, p. 461–470, 2006.

ANDERSSON, H.; ASP, N-G.; BRUCE, A.; ROOS, S.; WADSTROM, T.; WOLD, A.E. Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies. **Scand J Nutr** 45:58–75, 2001.

ARIFA, R.D.; MADEIRA, M.F.; De PAULA, T.P.; LIMA, R.L.; TAVARES, L.D.; MENEZES-GARCIA, Z; FAGUNDES, C.T.; RACHID, M.A.; RYFFEL, B.; ZAMBONI, D.S.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice. **Am J Pathol.** v. 184(7), p. 2023-34, 2014

BAILLY C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. **Pharmacol Res.** v. 148:104398, 2019.

BARROS, C. P.; GUIMARÃES, J. T.; ESMERINO, E. A.; DUARTE, M. C. K. H.; SILVA, M. C.; SILVA, R.; CRUZ, A. G. Paraprobiotics and postbiotics: concepts and potential applications in dairy products. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 1-8, 2020.

BARROSO, Fernanda Alvarenga Lima *et al.* Article intake of lactobacillus delbrueckii (Pexu:Hsp65) prevents the inflammation and the disorganization of the intestinal mucosa in a mouse model of mucositis. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–27, 2021.

BECKERSON, J.; JONES, N.; LODHIA, S. Dietary advice during neutropenia. An update and consensus from the Haematology subgroup of the BDA Oncology Group. **Complete Nutr.** v. 12(6), p. 40–42, 2012.

BHATT, Aadra P *et al.* Targeted inhibition of gut bacterial β -glucuronidase activity enhances anticancer drug efficacy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 117, n. 13, p. 7374–7381, 2020.

BOWEN, J.M.; STRINGER, A.M.; GIBSON, R.J.; YEOH, A.S.; HANNAM, S.; KEEFE, D.M. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. **Cancer Biol Ther.** v. 6(9), p. 1449-1454, 2007.

BRON, P.A.; KLEEREBEZEM, M.; BRUMMER, R.J.; CANI, P.D.; MERCENIER, A.; MACDONALD, T.T.; GARCIA-RÓDENAS, C.L. Wells JM. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? **Br J Nutr.** v. 117(1), p. 93-107, 2017.

BRUNTON, L.L. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman.* Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 12ª ed., p. 1667, 1710-1712, 2012.

CABALLERO-FRANCO, C.; KELLER, K.; DE SIMONE, C.; CHADEE, K. The VSL# 3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology,** 292(1), p. 315-322, 2007.

CALON, A.; ESPINET, E.; PALOMO-PONCE, S.; TAURIELLO, D. V.; IGLESIAS, M.; CÉSPEDES, M. V.; BYROM, D. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. **Cancer cell.** v. 22(5), p. 571-584, 2012.

CARIO, E. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. **Current opinion in gastroenterology,** v. 24(6), p. 725-732, 2008.

CARIO, E. Toll-like receptors in the pathogenesis of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity. **Current opinion in supportive and palliative care,** v. 10(2), p. 157-164, 2016.

CARLOTTO, A.; HOGSETT, V.L.; MAIORINI, E.M.; RAZULIS, J.G.; SONIS, S.T. The economic burden of toxicities associated with cancer treatment: review of the literature and analysis of nausea and vomiting, diarrhoea, oral mucositis and fatigue. **Pharmacoeconomics,** v. 31(9), p. 753-766, 2013.

CASTRO-HERRERA, V.M.; RASMUSSEN, C.; WELLEJUS, A.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. *In Vitro* Effects of Live and Heat-Inactivated Bifidobacterium animalis Subsp. Lactis, BB-12 and Lactobacillus rhamnosus GG on Caco-2 Cells. **Nutrients.** v. 8;12(6):1719, 2020.

CECHINEL-ZANCHETT, Camile Cecconi *et al.* Flavonoid-rich fraction of Bauhinia forficata Link leaves prevents the intestinal toxic effects of irinotecan chemotherapy in IEC-6 cells and in mice. **Phytotherapy research : PTR,** England, v. 33, n. 1, p. 90–106, 2019.

CHAE, J.M.; CHANG, M.H.; HEO, W.; CHO, H.T.; LEE, D.H.; HWANG, B.B.; KIM, J.W.; YOON, S.M.; YANG, S.; LEE, J.H.; KIM, Y.J. LB-9, Novel Probiotic Lactic Acid Bacteria, Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice by

Inhibiting TNF- α -Mediated Apoptosis of Intestinal Epithelial Cells. **J Med Food**. v. 3, p.271-276, 2019.

CHEN, L.L.; WANG, X.H.; CUI, Y.; LIAN, G.H.; ZHANG, J.; OUYANG, C.H.; LU, F.G. Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice. **World J Gastroenterol**, v. 21;15(3), p. 321-327, 2009.

CHUANG, L.; WU, K. G.; PAI, C.; HSIEH, P. S.; TSAI, J. J.; YEN, J. H.; LIN, M. Y. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55(26), p. 11080-11086, 2007.

CHUNG, I. Che *et al.* Pretreatment with a heat-killed probiotic modulates the NLRP3 inflammasome and attenuates colitis-associated colorectal cancer in mice. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2019.

CIRILLO, M.; VENTURINI, M.; CICCARELLI, L.; COATI, F.; BORTOLAMI, O.; VERLATO, G. Clinician versus nurse symptom reporting using the National Cancer Institute-Common Terminology Criteria for Adverse Events during chemotherapy: results of a comparison based on patient's self-reported questionnaire. **Ann Oncol : Off J Eur Soc Med Oncol / ESMO**. v. 20(12), p.1929–35, 2009.

CONEN, A.; ZIMMERER, S.; TRAMPUZ, A.; FREI, R.; BATTEGAY, M.; ELZI, L. A pain in the neck: probiotics for ulcerative colitis. **Ann Intern Med**. v. 151(12), p. 895-7, 2009.

CROSS, M.L.; GANNER, A.; TEILAB, D.; FRAY, L.M. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 42(2), p. 173-80, 2004.

CUNHA, F. Q.; BOUKILI, M. A.; DA MOTTA, J. I. B.; VARGAFTIG, B. B., FERREIRA, S. H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **European journal of pharmacology**. v. 238(1), p. 47-52, 1993.

D'AMELIO, P.; SASSI, F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. **Calcif Tissue Int**. v. 102(4), p. 415-425, 2018.

DANTAS, A. B.; JESUS, V. F.; SILVA, R.; ALMADA, C. N.; ESMERINO, E. A.; CAPPATO, L. P.; SANT'ANA, A. S. Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. **Journal of Dairy Science**, v. 99(1), p.18-30, 2016.

DE ALENCAR, Nylane Maria Nunes *et al.* Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytotherapy research : PTR**, England, v. 31, n. 2, p. 312–320, 2017.

DE ALMADA, C.N.; ALMADA, C.N.; MARTINEZ, R.C.R.; SANT'ANA, A.S. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. **Trends Food Science & Technology**. v.58, p.96-114, 2016.

DE ALMEIDA, Carolina Vieira; TADDEI, Antonio; AMEDEI, Amedeo. The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. **Therapeutic advances in gastroenterology**, [s. l.], v. 11, p. 1756284818783606, 2018.

DINARELLO, Charles A *et al.* Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 4, p. 289, 2013.

DORNELAS-FILHO, Amílcar Figueiredo *et al.* Neutrophils contribute to the pathogenesis of hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 62, p. 96-108., 2018.

DORON, Shira; SNYDMAN, David R. Risk and safety of probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 60, n. Suppl 2, p. S129–S134, 2015.

DRANITSARIS, G.; MAROU, J.; SHAH, A. Severe chemotherapy induced diarrhea in patients with colorectal cancer: a cost of illness analysis. **Support Care Cancer**. v. 13, p.318–324, 2005.

DUNCAN, M. & GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther.* v.18, p. 853–874, 2003.

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

ELTING, L.S.; SHIH, Y.C.; STIFF, P.J.; BENSINGER, W.; CANTOR, S.B.; COOKSLEY, C.; SPIELBERGER, R.; EMMANOULIDES, C. Economic impact of palifermin on the costs of hospitalization for autologous hematopoietic stem-cell transplant: analysis of phase 3 trial results. **Biology Blood Marrow Transplant**. v. 13(7), p. 806–813, 2007.

ENZINGER PC, KULKE MH, CLARK JW *et al.* A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig Dis Sci**. 50(12), p. 2218-23, 2005.

FERNANDES, C.; WANDERLEY ,C.W.S.; SILVA, C.M.S.; MUNIZ, H.A.; TEIXEIRA, M.A.; SOUZA, N.R.P.; CÂNDIDO, A.G.F.; FALCÃO, R.B.; SOUZA, M.H.L.P.; ALMEIDA, P.R.C.; CÂMARA, L.M.C.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P. Role of regulatory T cells in irinotecan-induced intestinal mucositis, **Eur J Pharm Sci**. v. 30 (115), p. 158-166, 2018.

FRANKO, B.; VAILLANT, M.; RECULE, C.; VAUTRIN, E.; BRION, J.P.; PAVESE, P. *Lactobacillus paracasei* endocarditis in a consumer of probiotics. **Med Mal Infect**. v. 43(4), p. 171-3, 2013.

FRANZ, Charles M A P *et al.* Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International journal of food microbiology**, Netherlands, v. 151, n. 2, p. 125–140, 2011.

FUCHS, C.S.; MOORE, M.R.; HARKER, G.; VILLA, L.; RINALDI, D.; HECHT, J.R. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.** v. 21(5), p. 807–814, 2003.

- FUJII, H.; KOSHIYAMA, M.; KONISHI, M.; YOSHIDA, M., TAUCHI, K. Intermittent, repetitive administrations of irinotecan (CPT-11) reduces its side-effects. **Cancer detection and prevention**. v. 26(3), p. 210-212, 2002.
- FUJITA, K.; KUBOTA, Y.; ISHIDA, H.; SASAKI, Y. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 21(43), p. 12234-12248, 2015.
- GERRITS, C.J.; de JONGE, M.J.; SCHELLENS JH, STOTER G, VERWEIJ J Topoisomerase I inhibitors: the relevance of prolonged exposure for present clinical development. **Br J Cancer**. v.76(7), p. 952-62, 1997.
- 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, n. 9, p. 890-900, 2006.
- GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; ALVAREZ, E.; FINNIE, J.; KEEFE, D.M. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy**. v. 53(5), p. 360–369, 2007.
- GIBSON, R.J.; KEEFE, D.M.; LALLA, R.V.; BATEMAN, E.; BLIJLEVENS, N.; FIJLSTRA, M.; KING, E.E.; STRINGER, A.M.; VAN DER VELDEN, W.J.; YAZBECK, R.; ELAD, S.; BOWEN, J.M. Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**. v. 21(1), p. 313-26, 2013.
- GIBSON, R.J.; STRINGER, A.M. Chemotherapy-induced diarrhoea. **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 3(1), p. 31-35, 2009.
- GOTTELAND, M.; CRUCHET, S.; VERBEKE, S. Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 15, p. 11–17, 2001.
- GU, J.; ZHU, S.; LI, X.; WU, H.; LI, Y.; HUA, F. Effect of amifostine in head and neck cancer patients treated with radiotherapy: a systematic review and meta-analysis based on randomized controlled trials. **PLoS one**, v.9(5), 2014.
- GUABIRABA, R.; BESNARD, A.G.; MENEZES, G.B.; SECHER, T.; JABIR, M.S.; AMARAL, S.S.; BRAUN, H.; LIMA-JUNIOR, R.C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. TEIXEIRA MM, BEYAERT R, GRAHAM GJ, LIEW FY. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol**. v. 7(5), p.1079-93, 2014.
- HALL, P.D.; BENKO, H.; HOGAN, K.R.; STUART, R.K. The influence of serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol**. v. 23(12), p. 1256–60, 1995.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144 (5), p. 646 – 674, 2011.

IKUNO, N.; SODA, H.; WATANABE, M.; OKA, M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. **J Natl Cancer Inst.** v. 87(24), p. 1876-83, 1995.

INATOMI, Takio; OTOMARU, Konosuke. Effects of heat-killed *Enterococcus faecalis* T-110 supplementation on gut immunity, gut flora, and intestinal infection in naturally aged hamsters. **PloS one**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. e0240773, 2020.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em: 08/11/2018.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). O que é câncer? Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 30/07/2022.

ISIDRO, R.A.; LOPEZ, A.; CRUZ, M.L.; GONZALEZ TORRES, M.I.; CHOMPRES, G.; ISIDRO, A.A.; APPELYARD, C.B. The Probiotic VSL#3 Modulates Colonic Macrophages, Inflammation, and Microflora in Acute Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis. **J Histochem Cytochem.** v. 65(8), p.445-461, 2017.

JONES, J.A.; AVRITSCHER, E.B.; COOKSLEY, C.D.; MICHELET, M.; BEKELE, B.N.; ELTING, L.S. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. **Support Care Cancer** v. 14(6), p. 505–515, 2006.

JUSTINO, Priscilla F.C. *et al.* Modulation of 5-fluorouracil activation of toll-like/MyD88/NF- κ B/MAPK pathway by *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 probiotic. **Cytokine**, [s. l.], v. 125, n. July 2019, p. 154791, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154791>.

KEEFE, D. M.; SCHUBERT, M. M. Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**. v. 109 (5), p. 820 – 31, 2007.

KHAGEH HOSSEINI, S.; KOLTERER, S.; STEINER, M.; VON MANSTEIN, V.; GERLACH, K.; TROJAN, J.; WAIDMANN, O.; ZEUZEM, S.; SCHULZE, J.O.; HAHN, S.; STEINHILBER, D.; GATTERDAM, V.; TAMPÉ, R.; BIONDI, R.M.; PROSCHAK, E.; ZÖRNIG, M. Camptothecin and its analog SN-38, the active metabolite of irinotecan, inhibit binding of the transcriptional regulator and oncoprotein FUBP1 to its DNA target sequence FUSE. **Biochem Pharmacol.** v. 146, p. 53-62, 2017.

KOLIARAKIS, I.; PSAROULAKI, A.; NIKOLOUZAKIS, T. K.; KOKKINAKIS, M.; SGANTZOS, N.; GOULIELMOS, G.; ANDROUTSOPOULOS, V.P.; TSIAOUSSIS, J.; TSATSAKIS, A.; KOKKINAKIS, M. **Intestinal microbiota and colorectal cancer: a new aspect of research** Ioannis. **J Buon.** v. 23(5), p. 1216-1234, 2018.

KRAWCZYK, Beata *et al.* The Many Faces of *Enterococcus* spp.-Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 9, 2021.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 46(3), p. 211-220, 2000.

KWEEKEL, D.; GUCHELAAR, H. J.; GELDERBLUM, H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. **Cancer treatment reviews**, v. 34(7), p. 656-669, 2008.

LALLA, R.V.; BOWEN, J.; BARASCH, A.; ELTING, L.; EPSTEIN, J.; KEEFE, D.M.; RABER-DURLACHER, J. E. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120(10), p. 1453-1461, 2014.

LAND, M. H.; ROUSTER-STEVENS, K.; WOODS, C. R.; CANNON, M. L.; CNOTA, J.; SHETTY, A. K. Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. **Pediatrics**, v. 115(1), p. 178-181, 2005.

LANGER, C.J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. **Oncology**, 18 (7), p. 17-28, 2004.

LEE, B.; MIN, J.A.; NASHED, A.; LEE, S.O.; YOO, J.C.; CHI, S.W.; YI, G.S. A novel mechanism of irinotecan targeting MDM2 and Bcl-xL. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 514(2), p. 518-523, 2019.

LEITÃO, R.F.; BRITO, G.A.; ORIÁ, R.B.; BRAGA-NETO, M.B.; BELLAGUARDA, E.A.; SILVA, J.V.; GOMES, A.S.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; SIQUEIRA, F.J.; FREIRE, R.S.; VALE, M.L.; RIBEIRO, R.A. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterol**, v. 11, n. 1, p. 1, 2011.

LEITÃO, R.F.; RIBEIRO, R.A.; BELLAGUARDA, E.A.; MACEDO, F.D.; SILVA, L.R.; ORIÁ, R.B.; VALE, M.L.; CUNHA, F.Q.; BRITO, G.A. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 59(5), p. 603-12, 2007.

LI, N.; RUSSELL, W.M.; DOUGLAS-ESCOBAR, M.; HAUSER, N.; LOPEZ, M.; NEU, J. Live and heat-killed Lactobacillus rhamnosus GG: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. **Pediatr Res.**, v. 66(2), p. 203-207, 2009.

LIMA-JUNIOR R.C. **Estudo morfofuncional e dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos: Papel da Caspase-1, Interleucina-18 e óxido nítrico**. Fortaleza; 2008. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará].

LIMA-JÚNIOR, R.C.; FIGUEIREDO, A.A.; FREITAS, H.C.; MELO, M.L.; WONG, D.V.; LEITE, C.A.; MEDEIROS, R.P.; MARQUES-NETO, R.D.; VALE, M.L.; BRITO, G.A.; ORIÁ, R.B.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal

mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 69(4), p. 931-42, 2012.

LIMA-JÚNIOR, R.C.; FREITAS, H.C.; WONG, D.V.; WANDERLEY, C.W.; NUNES, L.G.; LEITE, L.L.; MIRANDA, S.P.; SOUZA, M.H.; BRITO, G.A.; MAGALHÃES, P.J.; TEIXEIRA, M.M.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Pharmacol.** v. 171, p. 2335-50, 2014.

LIU, L.F.; DESAI, S.D.; LI, T.K.; MAO, Y.; SUN, M.; SIM, S.P. Mechanism of action of camptothecin. **Ann N Y Acad Sci.**; v. 922, p 1–10, 2000.

LIU, M.; WU, Q.; WANG, M.; FU, Y.; WANG, J. Lactobacillus rhamnosus GR-1 Limits Escherichia coli-Induced Inflammatory Responses via Attenuating MyD88-Dependent and MyD88-Independent Pathway Activation in Bovine Endometrial Epithelial Cells. **Inflammation.** v. 4, p. 1483-94, 2016.

LOGAN, R. M.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer chemotherapy and pharmacology.** v. 62(1), p. 33-41, 2008.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? **Cancer chemotherapy and pharmacology.** v. 63(2), p. 239-251, 2009.

MACHADO, A. B. F.; MOREIRA, A. P. B.; ROSA, D. D.; PELUZIO, M. C. G.; TEIXEIRA, T. F. S. Microbiota Gastrintestinal: Evidências de sua influência na saúde e na doença. 1ª edição. Rio de Janeiro: Rubio, 2015.

MACPHERSON, B.R.; PFEIFFER, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion.* v. 17(2), p. 135–50, 1978.

MAJUMDAR, S. R.; FLETCHER, R. H.; EVANS, A. T. How does colorectal cancer present? Symptoms, duration, and clues to location. **American Journal of Gastroenterology.** v. 94(10), p. 3039–3045, 1999.

MAKIMOTO, A.; MUGISHIMA, H.; TAGA, T.; ISHIDA, Y.; NAGATOSHI, Y.; IDA, K.; KUMAGAI, M.; KIMURA, T.; OHASHI, Y.; KANEKO, M. Registration-directed phase 1/2 trial of irinotecan for pediatric solid tumors. **Pediatr Int.** v. 61(5), p. 453-458, 2019

MATHIJSEN, R.H.; LOOS, W.J.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. **Curr Cancer Drug Targets,** v. 2(2), p. 103–123, 2002.

MATSUMOTO, Hiroki *et al.* Effects of organic acid, Enterococcus faecalis strain EC-12 and sugar cane extract in feed against enterotoxigenic Escherichia coli-induced diarrhea in pigs. **AMB Express,** [s. l.], v. 11, n. 1, p. 68, 2021.

- MEINI, S.; LAUREANO, R.; FANI, L.; TASCINI, C.; GALANO, A.; ANTONELLI, A.; ROSSOLINI, G.M. Breakthrough *Lactobacillus rhamnosus* GG bacteremia associated with probiotic use in an adult patient with severe active ulcerative colitis: case report and review of the literature. **Infection**. v. 43(6), p. 777-81, 2015.
- MELO, M.L.; BRITO, G.A.; SOARES, R.C.; CARVALHO, S.B.; SILVA, J.V.; SOARES, P.M.; VALE, M.L.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 61(5), p.775-84. 2008.
- MENG, X.C.; WANG, Y.N.; YAN, P.G.; LI, Y.H.; WANG, H.Y.; QIAN, J.M.; LI, J.N. Effect of VSL#3 and *S.Boulardii* on intestinal microbiota in mice with acute colitis. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. v. 11;99(22), p. 1735-1742, 2019.
- MIYAMOTO, Shingo *et al.* Preventive Effects of Heat-Killed *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 on Mouse Intestinal Tumor Development. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 18, n. 4, 2017.
- MIYAZAWA, K.; HE, F.; KAWASE, M.; KUBOTA, A.; YODA, K.; HIRAMATSU, M. Enhancement of immunoregulatory effects of *Lactobacillus gasseri* TMC0356 by heat treatment and culture medium. **Letters in applied microbiology**, v. 53(2), p. 210-216, 2011.
- MURATA, M.; KONDO, J.; IWABUCHI, N.; TAKAHASHI, S.; YAMAUCHI, K.; ABE, F.; MIURA, K. Effects of paraprobiotic *Lactobacillus paracasei* MCC1849 supplementation on symptoms of the common cold and mood states in healthy adults. **Beneficial Microbes**. v. 9(6), p. 855-864, 2018.
- NAQVI, S.S.B.; NAGENDRA, V.; HOFMEYER, A. Probiotic related *Lactobacillus rhamnosus* endocarditis in a patient with liver cirrhosis. **IDCases**. v. 13:e00439, 2018.
- NOBRE, LMS. **Abatacept agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos**. Fortaleza; 2015. [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará].
- NOVICK, D *et al.* A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. **Cytokine**, England, v. 14, n. 6, p. 334–342, 2001.
- PASALA, Swetha *et al.* *Lactobacillus* endocarditis in a healthy patient with probiotic use. **IDCases**, [s. l.], v. 22, p. e00915, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2020.e00915>.
- OU, C. C.; LIN, S. L.; TSAI, J. J.; LIN, M. Y. Heat-Killed Lactic Acid Bacteria Enhance Immunomodulatory Potential by Skewing the Immune Response toward Th1 Polarization. **Journal of food science**, v. 76(5), p. 260-267, 2011.
- OUWEHAND, A.C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Benef Microbes**. v. 26;8(2), p. 143-151, 2017.

PASALA, S.; SINGER, L.; ARSHAD, T.; ROACH, K. Lactobacillus endocarditis in a healthy patient with probiotic use. **IDCases**. v. 22:e00915, 2020.

PELUZIO, Maria do Carmo Gouveia; MARTINEZ, J. Alfredo; MILAGRO, Fermin I. Postbiotics: Metabolites and mechanisms involved in microbiota-host interactions. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 108, n. March 2020, p. 11–26, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.004>.

PEREZ, E.A.; HILLMAN, D.W.; MAILLIARD, J.A.; INGLE, J.N.; RYAN, J.M.; FITCH, T.R.; ROWLAND, K, M.; KARDINAL, C.G.; KROOK, J.E.; KUGLER, J.W.; DAKHIL, S.R. Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline, a taxane, or both. **J Clin Oncol**, 22 (14), p. 2849-2855, 2004.

PETERSON, D.E.; BENSADOUN, R.J.; ROILA, F. ESMO Guidelines Working Group. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Ann Oncol**. Suppl 6(Suppl 6):vi78-84, 2011.

PITOT, H. C.; WENDER, D. B.; O'CONNELL, M. J.; SCHROEDER, G.; GOLDBERG, R. M.; RUBIN, J.; LEVITT, R. Phase II trial of irinotecan in patients with metastatic colorectal carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**. v. 15(8), p. 2910-2919, 1997.

POKROWIECKI, R.; MIELCZAREK, A.; ZARĘBA, T.; TYSKI, S. Oral microbiome and peri-implant diseases: where are we now? **Therapeutics and clinical risk management**, v.13, p. 1529, 2017.

POURQUIER, P.; JENSEN, A. D.; GONG, S. S.; POMMIER, Y.; ROGLER, C. E. Human DNA topoisomerase I-mediated cleavage and recombination of duck hepatitis B virus DNA *in vitro*. **Nucleic Acids Res**. v. 27, p. 1919–1923, 1999.

QUARESMA, M.; DAMASCENO, S.; MONTEIRO, C.; LIMA, F.; MENDES, T.; LIMA, M.; JUSTINO, P.; BARBOSA, A.; SOUZA, M.; SOUZA, E.; SOARES, P. Probiotic mixture containing Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Nutr Cancer**. v. 72(8), p. 1355-1365, 2020.

QUINTANILHA, Mônica F. *et al.* Bifidobacterium longum subsp. longum 51A attenuates intestinal injury against irinotecan-induced mucositis in mice. **Life Sciences**, [s. l.], v. 289, n. December 2021, 2022.

RAMESH, M.; AHLAWAT, P.; SRINIVAS, N. R. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. **Biomedical Chromatography**. v. 24(1), p. 104-123, 2010.

RAMOS, M. G.; BAMBIRRA, E. A.; CARA, D. C.; VIEIRA, E. C.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Oral administration of short-chain fatty acids reduces the intestinal mucositis caused by treatment with Ara-C in mice fed commercial or elemental diets. **Nutr Cancer**. v. 28, p 212–217, 1997.

RAMPENGAN, N. H.; MANOPPO, J.; WAROUW, S. M. Comparison of efficacies between live and killed probiotics in children with lactose malabsorption. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 41(2), p. 474-481, 2010.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 7^a ed., p. 673 – 676, 2012.

RAUTIO, M.; JOUSIMIES-SOMER, H.; KAUMA, H.; PIETARINEN, I.; SAXELIN, M.; TYNKKYNEN, S.; KOSKELA, M.; Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. **Clin Infect Dis**. v. 28(5), p. 1159-60, 1999.

REDMAN, M. G., WARD, E. J. & PHILLIPS, R. S. The efficacy and safety of probiotics in people with cancer: a systematic review. **Ann. Oncol**. v. 25, p. 1919–1929, 2014.

RIBEIRO, R.A.; WANDERLEY, C.W.; WONG, D.V.; MOTA, J.M.; LEITE, C.A.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; LIMA-JÚNIOR, R.C. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 78(5), p.881-893, 2016.

RIBRAG, V.; KOSCIELNY, S.; VANTELON, J.M.; FERMÉ, C.; RIDELLER, K.; CARDE, P.; BOURHIS, J.H.; MUNCK, J.N. Phase II trial of irinotecan (CPT-11) in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma**. 44(9), p. 1529-33, 2003.

RITCHIE, M. L. & ROMANUK, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. **PLoS ONE**, v. 7: e34938, 2012.

RIVORY, L. P.; BOWLES, M. R.; ROBERT, J.; POND, S. M. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. **Biochemical pharmacology**. v. 52(7), p. 1103-1111, 1996.

RIVORY, L.P.; ROBERT, J. Identification and kinetics of a beta-glucuronide metabolite of SN-38 in human plasma after administration of the camptothecin derivative irinotecan. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 36(2), p. 176-9, 1995.

RIVORY, L.P.; ROBERT, J. Molecular, cellular, and clinical aspects of the pharmacology of 20(S)camptothecin and its derivatives. **Pharmacol Ther**. v. 68(2), p. 269-96, 1995.

ROBERFROID, M. Prebiotics: the concept revisited. **J Nutr** v.137, p.830–837, 2007.

ROCHA-LIMA, C.M.; GREEN, M.R.; ROTCHE, R.; MILLER, W.H JR; JEVREY, G.M.; CISAR, L.A.; MORGANTI, A.; ORLANDO, N.; GRUIA, G.; MILLER, L.L. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. **J Clin Oncol**, 22, p. 18-21, 2004.

ROUGIER, P.; BUGAT, R.; DOUILLARD, J. Y.; CULINE, S.; SUC, E.; BRUNET, P.; BONNETERRE, J.; Phase II study of irinotecan in the treatment of advanced colorectal

cancer in chemotherapy-naive patients and patients pretreated with fluorouracil-based chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**. v. 15(1), p. 251-260, 1997.

RUBENSTEIN, E.B.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.; EPSTEIN, J. et al. Mucositis study section of the multinational association for supportive care in cancer; international society for oral oncology. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**. v. 100(9 Suppl), p. 2026–2046, 2004.

RUDAKOVA, E.V.; BOLTNEVA, N.P.; MAKHAEVA, G.F. Comparative analysis of esterase activities of human, mouse, and rat blood. **Bull Exp Biol Med**. v. 152(1), p.73-5, 2011.

SALTZ, L.B.; DOUILLARD, J.Y.; PIROTTA, N.; ALAKL, M.; GRUIA, G.; AWAD, L. et al Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. **Oncologist**. v. 6, p.81–91, 2001.

SANTOS, A.; ZANETTA, S.; CRESTEIL, T.; DEROUSSENT, A.; PEIN, F.; RAYMOND, E.; VERNILLET, L.; RISSE, M.L.; BOIGE, V.; GOUYETTE, A.; VASSAL, G. Metabolism of irinotecan (CPT-11) by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. **Clin Cancer Res**. v. 6(5), p. 2012-20, 2000.

SAWADA, D.; SUGAWARA, T.; ISHIDA, Y.; AIHARA, K.; AOKI, Y.; TAKEHARA, I.; FUJIWARA, S. Effect of continuous ingestion of a beverage prepared with *Lactobacillus gasseri* CP2305 inactivated by heat treatment on the regulation of intestinal function. **Food Research International**. v.79, p. 33- 39, 2016.

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

SCHEITHAUER, Torsten P M *et al*. Causality of small and large intestinal microbiota in weight regulation and insulin resistance. **Molecular metabolism**, [s. l.], v. 5, n. 9, p. 759–770, 2016.

SEONG, G.; LEE, S.; MIN, Y.W.; JANG, Y.S.; KIM, H.S.; KIM, E.J.; PARK, S.Y.; KIM, C.H.; CHANG, D.K. Effect of Heat-Killed *Lactobacillus casei* DKGF7 on a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome. **Nutrients**. v. 9;13(2):568, 2021.

SEZER, A.; USTA, U.; CICIN, I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. **Medical Oncology**. v. 26, p. 350-357, 2009.

SHI, N.; LI, N.; DUAN, X.; NIU, H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. **Mil Med Res**. v. 27, p.4:14, 2017.

SOARES, P.M.; LIMA-JUNIOR, R.C.; MOTA, J.M.; JUSTINO, P.F.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; SOUZA, M.H. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 68(3), p. 713-20, 2011.

- 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(1), p. 46-9, 2013.
- SONIS, S.; ELTING, L.; KEEFE, D. et al. Unanticipated frequency and consequences of regimen-related diarrhea in patients being treated with radiation or chemoradiation regimens for cancers of the head and neck or lung. **Support Care Cancer**, v. 23, p 433–439, 2015.
- SONIS, S.T.; ELTING, L.S.; KEEFE, D.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B.N.; RADER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J.P.; RUBENSTEIN, E.B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, 100(9):1995-2025, 2004.
- STEIN, A.; VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. **Ther Adv Med Oncol**. v. 2(1), p. 51–63, 2010.
- STRINGER, A.M.; GIBSON, R.J.; LOGAN, R.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.; BURNS, J.; KEEFE, D.M. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. **Exp Biol Med** (Maywood), v.232(1), p. 96-106. 2007.
- STRINGER, A. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. **Nutrients**, v. 5(5), p. 1488-1499, 2013.
- TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). **Genes & nutrition**, v. 6(3), p. 261, 2011.
- TERAZAWA, T.; GOTO, M.; MIYAMOTO, T.; ASAISHI, K.; SHIMAMOTO, F.; KUWAKADO, S.; NISHITANI, H.; KII, T.; HIGUCHI, K. Efficacy of Prophylactic G-CSF in Patients Receiving FOLFIRINOX: A Preliminary Retrospective Study. **Intern Med**. v. 54(23), p. 2969-73, 2015.
- TOUCHEFEU, Y.; MONTASSIER, E.; NIEMAN, K.; GASTINNE, T.; POTEL, G.; BRULEY DES VARANNES, S.; DE LA COCHETIÈRE, M. F. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy-or radiation-induced gastrointestinal mucositis—current evidence and potential clinical applications. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 40(5), p. 409-421, 2014.
- TRINDADE, Luísa Martins *et al.*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], n. 0123456789, 2021.
- ULLUWISHEWA, D.; ANDERSON, R. C.; MCNABB, W. C.; MOUGHAN, P. J.; WELLS, J. M.; ROY, N. C. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. **The Journal of nutrition**, v. 141(5), p. 769-776, 2011.

VAN VLIET, M. J.; HARMSSEN, H. J.; DE BONT, E. S.; TISSING, W. J. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLoS pathogens**, v. 6(5), 2010.

VILLENA, J.; BARBIERI, N.; SALVA, S.; HERRERA, M.; ALVAREZ, S. Enhanced immune response to pneumococcal infection in malnourished mice nasally treated with heat-killed *Lactobacillus casei*. **Microbiology and immunology**, v. 53(11), p. 636-646, 2009.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: discovery to clinic — thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture. **Cancer Res.** v. 55, p. 753–760, 1995.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** v. 3, p. 430–440, 2002.

WANG, Y.; XIE, J.; WANG, N.; LI, Y.; SUN, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, H. *Lactobacillus casei* Zhang modulate cytokine and Toll-like receptor expression and beneficially regulate poly I: C-induced immune responses in RAW264.7 macrophages. **Microbiology and immunology**, v. 57(1), p. 54-62, 2013.

WARDILL, H.R.; BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J. Chemotherapy-induced gut toxicity: are alterations to intestinal tight junctions pivotal? **Cancer chemotherapy and pharmacology**. v. 70, p. 627-35, 2012.

WARDILL, H.R.; BOWEN, J.M.; VAN SEBILLE, Y.Z.; SECOMBE, K.R.; COLLIER, J.K.; BALL, I.A.; LOGAN, R.M.; GIBSON, R.J. TLR4-Dependent Claudin-1 Internalization and Secretagogue-Mediated Chloride Secretion Regulate Irinotecan-Induced Diarrhea. **Mol Cancer Ther.** v. 15(11), p. 2767-2779, 2016.

WATSON, A.J.; COLLINS, P.D. Colon cancer: A civilization disorder. *Dig Dis* v. 29, p.222-228. 2011.

WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, C. B.; BORGES, V. F.; WANDERLEY, C. W.; BEM, A. X.; CUNHA, T. M. The adaptor protein Myd88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **PLoS one**. v. 10(10), e0139985, 2015.

WONG, D.V.T.; RIBEIRO-FILHO, H.V.; WANDERLEY, C.W.S.; LEITE, C.A.V.G.; LIMA, J.B.; ASSEF, A.N.B.; CAJADO, A.G.; BATISTA, G.L.P.; GONZÁLEZ, R.H.; SILVA, K.O.; BORGES, L.P.C.; ALENCAR, N.M.N.; WILKE, D.V.; CUNHA, T.M.; FIGUEIRA, A.C.M.; CUNHA, F.Q.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P. SN-38, the active metabolite of irinotecan, inhibits the acute inflammatory response by targeting toll-like receptor 4. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. (2), p. 287-298, 2019.

WONG, Deysi Viviana Tenazoa *et al.* TLR4 deficiency upregulates TLR9 expression and enhances irinotecan-related intestinal mucositis and late-onset diarrhoea. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 178, n. 20, p. 4193–4209, 2021.

World Health Organization. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 08/04/2021.

WU, H.; XIE, S.; MIAO, J.; LI, Y.; WANG, Z.; WANG, M.; YU, Q. *Lactobacillus reuteri* maintains intestinal epithelial regeneration and repairs damaged intestinal mucosa. **Gut Microbes**. v. 11(4), p. 997-1014, 2020.

XU, C.-J.; GRAINGE, I.; LEE, J.; HARSHEY, R. M.; JAYARAM, M. Unveiling two distinct ribonuclease activities and a topoisomerase activity in a site-specific DNA recombinase. **Mol. Cell**. v. 1, p. 729–739, 1998.

YAN, F.; POLK, D.B. Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. **Gut Microbes**. v. 3(1), p. 25-8, 2012.

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. **Benef Microbes**, v. 6(1), p. 113-118, 2015.

ZHANG, Y.; DAVIS, C.; SHAH, S.; HUGHES, D.; RYAN, J. C.; ALTOMARE, D.; PEÑA, M. M. IL-33 promotes growth and liver metastasis of colorectal cancer in mice by remodeling the tumor microenvironment and inducing angiogenesis. **Molecular carcinogenesis**, v. 56(1), p. 272-287, 2016.

ZHUO, Q.; YU, B.; ZHOU, J.; ZHANG, J.; ZHANG, R.; XIE, J.; WANG, Q.; ZHAO, S. Lysates of *Lactobacillus acidophilus* combined with CTLA-4-blocking antibodies enhance antitumor immunity in a mouse colon cancer model. **Sci Rep**. v. 9(1):20128, 2019.