

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Dissertação

**EFEITO DA LEVEDURA *PICHIA PASTORIS* SOBRE PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS
SWISS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM CICLOFOSFAMIDA**

Letícia Rodrigues da Cunha

Pelotas, 2016

LETÍCIA RODRIGUES DA CUNHA

**EFEITO DA LEVEDURA *PICHIA PASTORIS* SOBRE PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS
SWISS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM CICLOFOSFAMIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Ângela Nunes Moreira

Co-orientadores: Renata Torres Abib

Lucieli Savegnago

Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C972e Cunha, Letícia Rodrigues da

Efeito da levedura *pichia pastoris* sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos swiss submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida / Letícia Rodrigues da Cunha ; Angela Nunes Moreira, orientadora. — Pelotas, 2016.

100 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Probióticos. 2. Variação de peso. 3. Lesões histopatológicas. 4. Peroxidação lipídica. 5. Leucograma. I. Moreira, Angela Nunes, orient. II. Título.

CDD : 614.5

Agradecimentos

Às professoras da nutrição Renata pela ajuda no desenvolvimento desse projeto e à Simone por me ouvir e me estimular a seguir em frente.

À prof. Bilica por me ajudar, me ensinar, me acalmar e me mostrar que nada estava perdido, quando eu achava que tinha dado tudo errado.

Agradeço aos colegas dos laboratórios 1, 4, 6, 7, laboratório da prof. Lucielli e laboratório do prof. Allan do centro de biotecnologia pela ajuda, disponibilidade e paciência.

Agradeço ao Seu Roberto, Seu Luiz e Fabi por me receberem no biotério com dedicação, paciência e carinho e especialmente à Anelize por estar sempre à disposição para o que precisasse, por ter me ensinado vários procedimentos e sempre de coração aberto.

A prof. Marta Amaral por participar desse trabalho e me explicar pacientemente os procedimentos que deveriam ser feitos.

Ao mestrando em Zootecnia Alexandre Bilhalva pela disponibilidade em participar desse trabalho.

À minha orientadora prof. Ângela por aceitar minha sugestão de realizarmos o projeto na minha área de trabalho, oncologia, por me inserir no “mundo dos probióticos e micro-organismos” e me oferecer um trabalho muito mais rico do que eu planejava anteriormente.

À Khadija que chegou a pouco tempo, mas foi muito importante para me ajudar nas últimas atividades.

À Suely, como sempre te digo, se não fosse por ti nada disso seria possível! Tu foste muito importante, ou melhor essencial, durante todo o desenvolvimento desse projeto, muito obrigada!

À minha querida amiga Lislei (Lis, Lilis), quantas histórias para contar, quantas lágrimas, quantas risadas. Chegamos juntas nos laboratórios e juntas fomos descobrindo o que deveríamos fazer, não foi fácil, mas conseguimos! Obrigada Lilis, se não fosse a tua companhia, não sei o que seria de mim, estarás sempre no meu coração.

Às minhas queridas colegas e amigas Jéssica e Fran pelo companheirismo e por dividirmos as angústias e as alegrias durante todo o período de mestrado, vocês são essenciais e muito especiais!

Ao meu Bem, Aristênio, que há 8 anos está ao meu lado, caminhando junto, lutando e vencendo junto comigo! Obrigada Bem, pela compreensão, carinho e amor.

À minha amada afilhada, prima e irmã de coração, Glynda, por sempre me defender, me ajudar e me incentivar a lutar e seguir em frente. Obrigada também pelos momentos de relaxamento e risadas!

Ao meu pai, José Francisco, pelos ensinamentos deixados. Pai eu sei que onde estiveres, estás muito orgulhoso de tudo isso!

À minha Mãe, Clarisse, nunca vão existir palavras para descrever o que tu és para mim! Minha guerreira, minha amiga, meu exemplo, minha fortaleza, meu amor por ti é infinito! Se hoje cheguei até aqui foi graças a ti, pelo teu incentivo e pelo teu esforço para que eu estudasse, por acreditar na minha profissão e estar sempre ao meu lado, me dando colo e me acalmando nas tantas vezes que precisei!

À Deus pela vida que tenho, com saúde e cercada de pessoas que amo. Pela força para levantar nas quedas e não desistir diante das dificuldades!

“ O dinheiro faz homens ricos,
o conhecimento faz homens sábios
e a humildade faz grandes homens.”

Mahatma Gandhi

Resumo

CUNHA, Letícia Rodrigues. **Efeito da levedura *Pichia pastoris* sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos *Swiss* submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida**. 2016. 100 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Atualmente observa-se em diversos estudos o potencial dos probióticos de modular o sistema imune do hospedeiro e reduzir o estresse oxidativo. O antineoplásico ciclofosfamida (CF) tem como efeitos colaterais, o comprometimento da função de células do sistema imune, a indução do aumento de marcadores de estresse oxidativo e a ocorrência de danos renais e hepáticos. A levedura *Pichia pastoris* é atualmente utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes para a produção dos mais diferentes tipos de proteínas heterólogas. No entanto, alguns estudos vêm demonstrado que essa levedura possui propriedades probióticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a segurança da utilização da levedura *P. pastoris* (*P.p.*) em camundongos imunossuprimidos, bem como seu efeito sobre parâmetros imunológicos, histopatológicos e de estresse oxidativo em um modelo de imunossupressão induzida por ciclofosfamida (CF). Foram utilizados 20 camundongos *Swiss* machos, divididos em quatro grupos: controle, controle CF (tratados com 250 mg.kg⁻¹ de CF), controle *P. p* (suplementados com 10⁹ UFC.mL⁻¹) e CF + *P.p.* Foram realizados leucograma, análise histopatológica, pesagem dos animais e ensaio de TBARS. Foi observado que a CF reduziu os níveis de leucócitos, neutrófilos e linfócitos e *P. pastoris* foi capaz de aumentar o número de leucócitos e neutrófilos dos animais imunossuprimidos. Além disso, *P. pastoris* mostrou-se segura também em animais imunossuprimidos, não causando mortes. As análises histopatológicas demonstraram que a CF causou lesões renais e hepáticas e *P. pastoris* foi capaz de reduzir as lesões hepáticas causadas pelo quimioterápico. Quando avaliado o estresse oxidativo, foi observado que *P. pastoris* reduziu os níveis de espécies reativas ao TBA no rim e cérebro dos animais tratados com CF e no fígado e cérebro de animais saudáveis. Dessa forma, a levedura *P. pastoris* demonstra um efeito protetor aos danos causados pela CF.

Palavras-chave: probióticos; variação de peso; lesões histopatológicas; leucograma; peroxidação lipídica.

Abstract

CUNHA, Letícia Rodrigues. **Effect of yeast *Pichia pastoris* on immunological and oxidative stress parameters in Swiss mice submitted to chemotherapy with cyclophosphamide**. 2016. 100 p. Dissertation (Master Degree em Nutrição e Alimentos) -Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Actually the potential of probiotics to modulate the host immune system and to reduce oxidative stress is being observed in several studies. Antineoplastic cyclophosphamide (CF) has the effect of compromising the immune system's cell function, inducing increased markers of oxidative stress, and causing renal and hepatic damage. *Pichia pastoris* yeast is currently used as a recombinant protein expression system for the production of the most different types of heterologous proteins. However, some studies have shown that this yeast possesses probiotic properties. The present study aimed to evaluate the safety of the use of the *P. pastoris* yeast, as well as its effect on immunological, histopathological and oxidative stress parameters in an immunosuppressive model. Twenty male Swiss mice were divided into four groups: control, CF control (250 mg.kg⁻¹), *P. p* control (10⁹ CFU.mL⁻¹) and CF + *P. p*. Leukogram, histopathological analysis, animal weighing and TBARS assay were performed. It was observed that CF reduced the levels of leukocytes, neutrophils and lymphocytes, and *P. pastoris* was able to increase the number of leukocytes and neutrophils of immunosuppressed animals. In addition, *P. pastoris* was also safe in immunosuppressed animals, not causing deaths. Histopathological analyzes demonstrated that CF caused renal and hepatic lesions and *P. pastoris* was able to reduce the hepatic lesions caused by chemotherapy. When oxidative stress was evaluated, it was observed that *P. pastoris* reduced the levels of TBA reactive species in the kidney and brain of animals treated with CF, and in the liver and brain of healthy animals. Therefore, *P. pastoris* yeast demonstrates a protective effect to CF damage.

Key words: probiotics; weight variation; histopathological injuries; leukogram; lipid peroxidation.

Lista de figuras

Figura 1. Delineamento do estudo..... 94

Figura 2. Número de animais com lesão renal (A) e hepática (B) no dia 17 (4 dias após a 2ª dose de CF), de camundongos Swiss não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de ciclofosfamida (CF), suplementados com 10⁹ UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* (*P. p*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P. p*). A CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média ± desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizado teste exato de Fischer seguido por teste de múltipla comparação para proporções. Letras diferentes representam diferenças significativas (p<0,05) 94

Figura 3. Número total (células/mm³) de leucócitos (A), neutrófilos (B) e linfócitos (C) no dia 17 (4 dias após a 2ª dose de CF) de camundongos Swiss não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de CF, suplementados com 10⁹ UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* (*P. p*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P. p*). A CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média ± desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizada ANOVA de duas vias. * p < 0,05..... 95

Figura 4. Número de animais que apresentaram perda de peso (A) e porcentagem de variação de peso (B) entre os dias 10 e 16, de camundongos Swiss não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de ciclofosfamida (CF), suplementados com 10⁹ UFC. mL⁻¹ *P. pastoris* (*P. p*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P. p*). A CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média ± desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizado teste exato de Fisher seguido por teste de múltipla comparação para proporções. Letras diferentes representam diferenças significativas (p < 0,05) (A) e ANOVA de duas vias, sendo * p < 0,05 (B)..... 96

Figura 5. Níveis de TBARS (nmol de MDA/g de tecido) no rim (A), fígado (B) e cérebro (C) no dia 17 (4 dias após a 2ª dose de CF), de camundongos *Swiss* não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de ciclofosfamida (CF), suplementados com 10⁹ UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* (*P. p.*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P. p.*). CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média ± desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizada ANOVA de duas vias * p < 0,05..... 97

Lista de Abreviaturas e Siglas

CAT	Catalase
CF	Ciclofosfamida
<i>C.perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
GPx	Glutational peroxidase
GSH	Glutational reduzida
GST	Glutational-S- transferase
MDA	Malondialdeído
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>P.p.</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>S. boulardii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa

Sumário

1 Introdução	11
2 Justificativa	14
3 Revisão de literatura	15
3.1 Impacto dos probióticos no sistema imune	15
3.2 Impacto dos probióticos no estresse oxidativo	17
3.3 <i>Pichia pastoris</i>	19
4 Objetivos	20
4.1 Objetivos geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
5 Hipóteses	21
6 Projeto	22
7 Relatório do trabalho de campo	75
8 Artigo	76
9 Considerações finais	88
Referências	89

1 Introdução

Atualmente observa-se em diversos estudos o potencial dos probióticos, não apenas de regular a microbiota das mucosas, mas também de modular o sistema imune do hospedeiro, atuando diretamente no desenvolvimento e na regulação da imunidade de forma sistêmica (COPPOLA & TURNES, 2004; SHIERACK et al., 2007; SCHAREK et al., 2007a; SCHAREK et al., 2007b; GENEROSO et al., 2011; CASTELLI, 2011; CARREIRO, 2013; SALVA et al., 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) probióticos são micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro.

Esses benefícios, que podem ser referentes à imunomodulação, são importantes principalmente em certos tratamentos, como a quimioterapia antineoplásica, que tem como consequência a imunossupressão (BUJALANCE et al., 2007; SALVA et al., 2014).

Um dos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer é a ciclofosfamida (CF), um agente antineoplásico do tipo alquilante que atua inespecificamente no ciclo celular, é metabolizado pelo fígado e excretado pelos rins (WAITZBERG, 2006). Sua metabolização forma dois compostos, a fosfaramida e a acroleína, sendo a primeira responsável pelo efeito citotóxico da CF (EMADI et al., 2009).

O tratamento com CF pode comprometer a capacidade de migração dos neutrófilos (MENDONÇA et al 2006) e a função de outras células do sistema imune, como os leucócitos (SALVA et al., 2014); induzir o aumento de marcadores de estresse oxidativo (FABER et al., 2011); gerar hepatotoxicidade (WAITZBERG, 2006); aumentar a permeabilidade intestinal (YANG et al., 2013) e o nível de citocinas (FABER et al., 2011). Além disso, essa medicação acarreta outros efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, alopecia, dermatite, amenorreia, oligoespermia, esterilidade, pneumonite, cistite hemorrágica e cardiotoxicidade. De acordo com Zuluaga et al. (2006), em modelo animal, a CF é capaz de reduzir as células do sistema imune após uma dosagem de 250 mg.kg⁻¹, levando à uma neutropenia severa e à uma redução de 92 % e 96 % de

linfócitos e monócitos, respectivamente. Além disso, outros estudos demonstraram que a CF induz o estresse oxidativo através do aumento da peroxidação lipídica e da redução da atividade de diversas enzimas antioxidantes (TRIPATHI & JENA, 2010; ABRAHAM & RABI, 2011).

A influência positiva dos probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos imunocomprometidos pela utilização de CF foi demonstrada por Salva et al. (2014). Nesse estudo foi observado valores de leucócitos e neutrófilos maiores nos grupos tratados com *Lactobacillus*. No entanto, outro estudo, também em modelo animal, concluiu que o probiótico *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) não teve efeito na modulação da imunossupressão induzida por CF (BUJALANCE et al., 2007).

O potencial antioxidante de probióticos também vem sendo estudado (OU et al., 2012; AMARETTI et al., 2013). Foi observado que bactérias ácido-láticas são capazes de reduzir o estresse oxidativo causado por doxorrubicina e o dano tóxico aos hepatócitos causados pelo tert-butil-hidroperóxido. Esse efeito protetor deve-se a redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e pela reativação de enzimas antioxidantes (OU et al., 2012; AMARETTI et al., 2013).

Além das bactérias já citadas, existem também leveduras probióticas. No entanto apenas duas leveduras são utilizadas com esse objetivo, são elas o *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) e o *Saccharomyces cerevisiae* (COPPOLA & TURNES, 2004).

As leveduras possuem vantagens quando comparadas a outros micro-organismos probióticos, pois elas podem ser liofilizadas, apresentam elevada produtividade a partir de substratos de baixo custo e não são afetadas pelo uso de antibacterianos (BLEHAUT et al., 1989; BODDY et al., 1991). Sendo assim é possível associar o uso de probióticos com o tratamento antibacteriano, indispensável em certas patologias (ARMUZZI et al., 2001).

P. pastoris é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*. Atualmente é utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes para a produção dos mais diferentes tipos de proteínas heterólogas, principalmente visando à produção de vacinas (CREGG, 2000; DUMMER et al., 2009 a; DUMMER et al., 2009 b; NIZOLI et al., 2009; CUNHA,

et al, 2011; DUMMER, et al., 2014; VIANA, et al., 2014; PINHEIRO et al., 2015; SIEDLER et al., 2017).

Estudos iniciais visando avaliar a utilização de *P. pastoris* como probiótico foram realizados na Universidade Federal de Pelotas. Foi demonstrado por Gil de Los Santos et al. (2012), em um estudo que avaliou as propriedades probióticas da *P. pastoris* e da *P. pastoris* recombinante em frangos de corte, que o ganho de peso dos animais que receberam a levedura, das duas formas, foi superior ao grupo controle. Além disso, a conversão alimentar dos grupos que receberam algum dos tipos de *P. pastoris* foi melhor do que no grupo controle. Foi avaliada também a soroconversão contra *C. perfringens*, a qual foi significativamente maior nos dois grupos que receberam *P. pastoris*. Foi observado também que os animais não apresentaram alterações histopatológicas significativas (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012).

Mais adiante França et al. (2015) realizou testes adicionais também com o objetivo de avaliar o efeito probiótico de *P. pastoris* e concluiu que essa levedura possui potencial para ser caracterizada como probiótico, pois é inócua e capaz de resistir à passagem através do trato gastrointestinal de mamíferos, de inibir o crescimento de *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) *in vitro*, e de proteger camundongos da infecção por *S. Typhimurium*.

2 Justificativa

O poder probiótico da levedura *Pichia pastoris* têm sido pouco estudado, mas apresenta resultados promissores. Sabe-se que a utilização de alguns probióticos pode auxiliar na estimulação do sistema imune e na redução da peroxidação lipídica. Diante disso, considera-se relevante um trabalho que avalie o efeito da *Pichia pastoris* no sistema imune e em parâmetros de estresse oxidativo de animais saudáveis e submetidos a tratamento quimioterápico, pois esse grupo pode ser beneficiado com probióticos que tenham funções imunoestimulantes. Para isso, é necessário primeiramente garantir que a levedura *Pichia pastoris* não haja como micro-organismo oportunista, causando algum dano, seja no sistema imune ou em algum tecido.

3 Revisão de literatura

3.1 Impacto dos probióticos no sistema imune

O sistema imune é responsável por defender o organismo de agentes infecciosos ou tóxicos (GUYTON & HALL, 2002). Sabe-se que 70 % do sistema linfóide está no intestino, onde estão presentes linfócitos T, B e fagócitos, com isso 20% das células intestinais são linfócitos e não enterócitos (CARREIRO, 2013).

Os probióticos e as bactérias patogênicas vivem em disputa constante por sítios de adesão e substratos no intestino humano, por isso uma microbiota saudável ajuda a impedir o crescimento de patógenos. Entre os diversos benefícios atribuídos aos probióticos, pode-se destacar os seguintes: antagonismo à patógenos, estímulo à imunidade, ação anticarcinogênica, produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias e redução das pró-inflamatórias, além de prevenção e tratamento de diversas patologias (CARREIRO, 2013).

Os *Lactobacillus* têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais que relacionam probióticos com a resposta imune (BUJALANCE et al, 2007; LIBOREDO et al, 2010; SALVA et al, 2014).

O tratamento quimioterápico pode causar efeitos deletérios nesse sistema de defesa. A infusão de CF em modelo animal, mesmo em um regime simplificado de 250 mg.kg⁻¹, pode levar a uma redução de 84 % das células brancas sanguíneas, já na primeira dose de 150 mg.kg⁻¹, e levar a leucopenia, na segunda dose. Já os linfócitos podem reduzir 92 % no primeiro dia após a aplicação de CF e os monócitos, 96 % após a segunda dose. Em relação à contagem de neutrófilos, a neutropenia severa apresenta-se já na primeira dose de CF e se mantém nos dias seguintes (ZULUAGA et al., 2006).

No estudo de Salva et al. (2014) foi demonstrado, em modelo animal, que no terceiro dia após o tratamento com baixa dosagem de CF (150 mg.kg⁻¹) os leucócitos chegaram ao seu menor valor. Quanto aos neutrófilos, houve redução significativa entre os dias dois e seis após a administração de CF. Na medula óssea, foi verificada diminuição significativa na contagem total de células.

Em outro estudo, que utilizou um protocolo de tratamento de 100 mg.kg^{-1} de CF, verificou-se que, após a quimioterapia, os animais ficaram severamente neutropênicos, quando comparados ao grupo controle. Além disso, houve redução no número de linfócitos e leucócitos totais (FABER et al., 2011). Esses resultados demonstram o potencial de imunossupressão da CF e confirmam que protocolos com baixa dosagem de CF, além de serem mais simples, são seguros e muito eficazes para modelos animais, pois são capazes de induzir neutropenia severa (< 10 neutrófilos/ mm^3) (ZULUAGA et al., 2006).

Salva et al. (2014) demonstrou a influência positiva de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos imunocomprometidos. Foi observado, em modelo animal de imunossupressão, valores de leucócitos maiores nos grupos tratados com *lactobacillus*, e retorno aos valores normais um dia antes do que o grupo que não recebeu probióticos. Além disso, os valores de neutrófilos dos grupos que receberam probióticos também foram significativamente maiores do que os do grupo controle. No entanto, outro estudo, também em modelo animal, concluiu que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não teve efeito na modulação da imunossupressão induzida por CF (BUJALANCE et al., 2007) e Liboredo et al. (2010) faz uma ressalva referente ao uso de alguns probióticos em condições debilitantes, pelo risco de translocação bacteriana e mortalidade.

3.2 Impacto dos probióticos no estresse oxidativo

Além de alterações no sistema imune, a CF causa alterações nos parâmetros de estresse oxidativo (TRIPATHI & JENA, 2010; ABRAHAM et al., 2011; PATRA et al., 2012; DIAZ-MONTERO et al., 2012). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os fatores antioxidantes e pró-oxidantes, com predomínio dos pró-oxidantes (radicais livres). Para manter o estresse oxidativo dentro dos níveis fisiológicos, existe o sistema de defesa antioxidante, o qual é essencial para impedir os danos oxidativos e consequentemente os danos sistêmicos gerados pelos radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Isso ocorre por meio de três mecanismos, sistemas de prevenção, sistemas varredores e sistemas de reparo. O sistema de prevenção é responsável por impedir a formação de radicais livres e espécies reativas, o sistema varredor impede a ação desses compostos e o sistema de reparo é capaz de facilitar o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas danificadas (KOURY & DONANGELO, 2003).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ter origem endógena ou exógena de fonte dietética. Já os antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathionaperoxidase (GPx) e atuam através do sistema de prevenção (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Os marcadores de estresse oxidativo são metabólitos específicos decorrentes da oxidação de biomoléculas, que ocorrem principalmente quando há um desequilíbrio entre antioxidantes e radicais livres ou espécies reativas, com predomínio de pró-oxidantes. Esses marcadores são advindos, principalmente, da oxidação lipídica, mas também podem ser derivados da oxidação de proteínas e DNA. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um exemplo de biomarcador derivado de oxidação lipídica (BARBOSA et al., 2010).

Foi observado, em modelo animal, que o tratamento com CF induziu um aumento do biomarcador de oxidação lipídica malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, e reduziu a glutathiona reduzida (GSH). Além disso, aumentou significativamente o dano ao DNA (TRIPATHI & JENA, 2010).

Um estudo que avaliou a hepatotoxicidade induzida por CF demonstrou que houve uma redução da atividade enzimática antioxidante das enzimas CAT, SOD, GPx e da glutathione-S-transferase (GST). Além de aumento de biomarcadores de estresse oxidativo, como o MDA e o óxido nítrico, ainda ocorreu diminuição de GSH e aumento do nível de TNF- α (EL-SHEIKH & RIFAAI, 2014). Patra et al. (2012) também demonstraram, em modelo animal, que a CF aumenta os níveis de MDA das células do fígado e da medula óssea, e reduz a atividade enzimática de GST e SOD de células da medula óssea. No entanto, nesse estudo foi observado um aumento da CAT de células hepáticas no grupo CF quando comparado ao controle.

O potencial antioxidante de probióticos vem sendo avaliado (OU et al., 2012; AMARETTI et al., 2013). Em um estudo, que avaliou o potencial antioxidante de diversas cepas de bactérias ácido-láticas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcuse* *Streptococcus thermophilus*) utilizadas concomitantemente, foi observado efeito na redução do estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico doxorubicina (AMARETTI et al., 2013). Foi observado também que as bactérias ácido-láticas são capazes de reduzir o dano tóxico aos hepatócitos causados pelo tert-butil-hidroperóxido. Esse efeito protetor deve-se a redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e pela reativação de enzimas antioxidantes (OU et al., 2012). Já em um estudo realizado com pacientes oncológicos que buscou avaliar os efeitos dos probióticos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, e *Streptococcus salivaris* sobre parâmetros de estresse oxidativo, não foi encontrada mudanças significativas nesses parâmetros (EBRAHIMI- MAMEGHANI et al., 2013).

3.3 *Pichia pastoris*

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é utilizada como plataforma de produção de proteínas heterólogas (CREGG et al., 1985; CREGG et al., 2000; LOVE et al., 2012) para a produção dos mais diferentes tipos de proteínas heterólogas, principalmente visando à produção de vacinas (SUGRUE et al., 1997; BISHT et al., 2001; WEI et al., 2003; YADAVA & OCKENHOUSE, 2003; VALDÉS et al., 2007; CANALES et al., 2008).

A *P. pastoris* é capaz de crescer a partir de substratos de baixo custo, inclusive rejeitos e efluentes industriais (CELIK et al. 2008; GIL DE LOS SANTOS et al. 2012), esse fato incentivou alguns pesquisadores a testá-la como probiótico na produção animal. No entanto, essa aplicação ainda foi pouco estudada, primeiramente foi tesada em frangos de corte e em sequência em camundongos (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012; FRANÇA, et al., 2015).

Estudos iniciais visando avaliar a utilização de *P. pastoris* como probiótico foram realizados na Universidade Federal de Pelotas. Em um estudo que avaliou as propriedades probióticas da *P. pastoris* e da *P. pastoris* recombinante em frangos de corte, observou-se que o ganho de peso dos animais que receberam a levedura, das duas formas, apresentaram ganho de peso superior ao grupo controle. Além disso, a conversão alimentar dos grupos que receberam algum dos tipos de *P. pastoris* foi melhor do que no grupo controle. Foi avaliada também a soroconversão contra *C. perfringens*, a qual foi significativamente maior nos dois grupos que receberam *P. pastoris* (GIL DE LOS SANTOS et al., 2012).

Mais adiante França et al. (2015) realizou testes adicionais também com o objetivo de avaliar o efeito probiótico da *P. pastoris* e concluiu que essa levedura possui potencial para ser caracterizada como probiótico, pois é inócua e capaz de resistir à passagem através do trato gastrointestinal de mamíferos, de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* *in vitro* e de proteger camundongos da infecção por *S. Typhimurium*.

4 Objetivos

4.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito da levedura *Pichia pastoris* sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a segurança da utilização da levedura *P. pastoris* em camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF, através da análise histopatológica do fígado e rins dos animais;
- Avaliar o efeito da levedura *P. pastoris* sobre o leucograma de camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF;
- Avaliar o efeito da levedura *P. pastoris* sobre o ganho de peso de camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF;
- Avaliar o efeito da levedura *P. pastoris* sobre a peroxidação lipídica no fígado, cérebro e rins de camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF, através da determinação dos níveis de TBARS.

4 Hipóteses

- A levedura *P. pastoris* é segura para utilização em animais submetidos a tratamento com CF.
- A levedura *P. pastoris* estimula o sistema imune de camundongos *Swiss* submetidos a tratamento quimioterápico com CF;
- A levedura *P. pastoris* estimula o ganho de peso de camundongos *Swiss* submetidos a tratamento quimioterápico com CF;
- A levedura *P. pastoris* reduz a peroxidação lipídica pela CF.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS



Projeto de dissertação

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROBIÓTICOS SOBRE PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM UM
MODELO ANIMAL DE NEUTROPENIA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA
COM CICLOFOSFAMIDA**

Letícia Rodrigues da Cunha

Pelotas, 2015

LETÍCIA RODRIGUES DA CUNHA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE PROBIÓTICOS SOBRE PARÂMETROS
IMUNOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM UM
MODELO ANIMAL DE NEUTROPENIA INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA
COM CICLOFOSFAMIDA**

Projeto de pesquisa para
Dissertação apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos
da Faculdade de Nutrição da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito parcial
à obtenção do título de Mestre em Nutrição
e Alimentos.

Orientadora: Ângela Nunes Moreira
Co-orientadores: Renata Torres Abib
Lucieli Savegnago

Pelotas, 2015

Resumo

CUNHA, Letícia Rodrigues. **Avaliação do efeito de probióticos sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em um modelo animal de neutropenia induzida por quimioterapia com ciclofosfamida.** 2015. 48 p. Projeto de dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A quimioterapia é um dos principais métodos terapêuticos para tratamento do câncer utilizados atualmente. A ciclofosfamida (CF), um dos quimioterápicos utilizados nesse tratamento, apresenta diversos efeitos tóxicos, entre eles a indução da neutropenia. Além de reduzir as células do sistema imune, a CF altera também os parâmetros de estresse oxidativo, aumentando a peroxidação lipídica e reduzindo as enzimas antioxidantes. Probióticos, cuja utilização vem sendo relacionada à melhora do sistema imune e de parâmetros de estresse oxidativo, vem sendo estudados visando melhorar esses parâmetros em modelos de neutropenia induzida por quimioterapia. O probiótico *B. Toyoi* vem sendo utilizado em alguns estudos relacionados à resposta imune, apresentando bons resultados. Entretanto, seu efeito sobre a imunossupressão e o estresse oxidativo induzidos pela quimioterapia ainda não foram avaliados. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do probiótico *B. Toyoi* nos parâmetros imunológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em um modelo animal de neutropenia induzida por quimioterapia com CF. Para isso 40 camundongos *Swiss* com 45 dias de idade serão divididos em quatro grupos, sendo o grupo 1 o grupo controle; os grupos 3 e 4 suplementados diariamente com 10^8 CFU.mL⁻¹ de esporos viáveis de *B. Toyoi* por gavagem; e os grupos 2 e 4 imunossuprimidos por CF (uma dose de 150 mg.kg⁻¹ de peso no dia dez e outra de 100 mg.kg⁻¹ no dia 13 do estudo). A suplementação com probiótico começará dez dias antes da primeira injeção de CF e continuará até o fim do estudo. Os animais sofrerão eutanásia no 17º dia de estudo. Amostras de sangue serão coletadas no momento da exsanguinação e o fígado, cérebro e rins serão removidos assepticamente. A segurança da utilização de *B. Toyoi* em imunossuprimidos com CF será avaliada através da observação da ocorrência de translocação do probiótico para outros órgãos e da análise histopatológica do intestino, fígado e rins dos animais. O efeito de *B. Toyoi* sobre o peso e a ingestão alimentar; o hemograma completo; os parâmetros bioquímicos aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e glicose; a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx e a peroxidação lipídica (através da determinação dos níveis de TBARS e de tiol não protéico) no fígado, cérebro e rins; os níveis de IgA intestinal; e os níveis de expressão das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e IFN- γ serão avaliados.

Palavras-chave: *Bacillus Toyoi*; camundongos *Swiss*; hemograma completo; parâmetros bioquímicos; peroxidação lipídica; enzimas antioxidantes; IgA intestinal; citocinas.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. Toyoi</i>	<i>Bacillus cereus</i> variedade Toyoi
CAT	Catalase
CF	Ciclofosfamida
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FAO	Food and agriculture organization
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IL-1	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL- 12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDA	Malondialdeído
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TNF	Fator de necrose tumoral

Sumário

1 Introdução	7
2 Justificativa	9
3 Referencial teórico	10
3.1 Impacto dos probióticos na neutropenia e nos parâmetros de estresse oxidativo causados por tratamento quimioterápico	10
3.2 <i>Bacillus cereus</i> variedade Toyoi	12
4 Objetivos	14
4.1 Objetivos geral	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
5 Hipóteses	15
6 Revisão de literatura	15
7 Material e Métodos	34
7.1 Probióticos e condições de cultivo.....	34
7.2 Animais e delineamento do estudo.....	34
7.3 Imunossupressão induzida por ciclofosfamida	36
7.4 Avaliação da segurança da suplementação com <i>B. Toyoi</i> de camundongos <i>Swiss</i> imunossuprimidos com ciclofosfamida	36
7.5 Avaliação do efeito de <i>B. Toyoi</i> sobre o peso corporal, ingestão alimentar, hemograma completo e outros parâmetros bioquímicos em camundongos <i>Swiss</i> imunossuprimidos com ciclofosfamida	37
7.6 Avaliação do efeito de <i>B. Toyoi</i> sobre o estresse oxidativo em tecido hepático, cerebral e renal de camundongos <i>Swiss</i> imunossuprimidos com ciclofosfamida.....	37
7.6.1 Peroxidação lipídica (TBARS)	37
7.6.2 Determinação de superóxido dismutase (SOD)	38

7.6.3 Determinação de catalase (CAT)	38
7.6.4 Determinação de glutathione peroxidase (GPx)	38
7.7 Avaliação do efeito de <i>B. Toyoi</i> sobre os níveis de IgA secretória no intestino de camundongos <i>Swiss</i> imunossuprimidos com ciclofosfamida	39
7.8 Avaliação do efeito de <i>B. Toyoi</i> sobre os níveis de expressão de citocinas em camundongos <i>Swiss</i> imunossuprimidos com ciclofosfamida	39
7.9 Análises estatísticas.....	40
8 Resultados e Impactos esperados	40
9 Aspectos éticos	40
10 Cronograma	41
11 Orçamento	42
Referências	44

1 Introdução

Por muito tempo o câncer foi considerado uma enfermidade típica de países desenvolvidos. Entretanto, há algumas décadas, devido à transição epidemiológica, esse padrão vem se modificando. Atualmente casos de câncer são frequentes também em países com médio e pouco recursos financeiros, como os países em desenvolvimento, tornando-se um problema de saúde pública (INCA, 2014).

Para o tratamento do câncer, podem ser utilizados diversos métodos, como a quimioterapia, a radioterapia, a cirurgia ou o transplante de medula óssea, os quais podem ser utilizados individualmente ou combinados (INCA, 2015a).

Sabe-se que os medicamentos antineoplásicos atingem todas as células do organismo, no entanto, afetam mais as células malignas. Isso ocorre devido ao crescimento diferenciado desses dois tipos celulares e às diferenças bioquímicas que eles apresentam. O tratamento quimioterápico possui efeitos tóxicos, os quais podem ser precoces, imediatos, tardios ou ultra-tardios (INCA, 2015b).

Um dos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer é a ciclofosfamida (CF), um agente antineoplásico do tipo alquilante que atua inespecificamente no ciclo celular, é metabolizado pelo fígado e excretado pelos rins (WAITZBERG, 2006). Sua metabolização forma dois compostos, a fosfaramida e a acroleína, sendo a primeira responsável pelo efeito citotóxico da CF (EMADI et al., 2009).

O tratamento com CF pode comprometer a capacidade de migração dos neutrófilos (MENDONÇA et al 2006) e a função de outras células do sistema imune, como os leucócitos (SALVA et al., 2014); induzir o aumento de marcadores de estresse oxidativo (FABER et al., 2011); gerar hepatotoxicidade (WAITZBERG, 2006); aumentar a permeabilidade intestinal (YANG et al., 2013) e o nível de citocinas (FABER et al., 2011). Além disso, essa medicação acarreta outros efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, alopecia, dermatite, amenorreia, oligoespermia, esterilidade, pneumonite, cistite hemorrágica e cardiotoxicidade. Por esses motivos, pacientes submetidos a tratamento quimioterápico com CF devem ser monitorados quanto à função hepática, renal e da medula óssea (WAITZBERG, 2006).

De acordo com Zuluaga et al. (2006), em modelo animal com camundongos albinos *Swiss*, a CF é capaz de reduzir as células do sistema imune após uma dosagem de 250 mg.kg⁻¹, levando à uma neutropenia severa e à uma redução de 92% e 96 % de linfócitos e monócitos, respectivamente. Além disso, outros estudos realizados com ratos, demonstraram que a CF induz estresse oxidativo através do aumento da peroxidação lipídica e da redução da atividade de diversas enzimas antioxidantes (TRIPATHI & JENA, 2010; ABRAHAM & RABI, 2011). Rehman et al. (2012) observaram que camundongos albinos *Swiss* submetidos a tratamento com CF apresentaram maiores níveis de nitrogênio uréico no sangue e creatinina, quando comparados ao grupo controle.

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Alguns probióticos, além de regularem a microbiota das mucosas, são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro, atuando diretamente no desenvolvimento e na regulação da imunidade não apenas local, mas também sistêmica (COPPOLA & TURNES, 2004; SHIERACK et al., 2007; SHAREK et al., 2007; GENEROSO et al., 2010; SHAREK et al., 2010; CASTELLI, 2011; CARREIRO, 2013; SALVA et al., 2014).

O potencial antioxidante de probióticos também vem sendo estudado (OU et al., 2012; AMARETTI et al., 2013). Foi observado que bactérias ácido-láticas são capazes de reduzir o estresse oxidativo causado por doxorrubicina e o dano tóxico aos hepatócitos causados pelo tert-butil-hidroperóxido. Esse efeito protetor deve-se a redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e pela reativação de enzimas antioxidantes (OU et al., 2012; AMARETTI et al., 2013).

A influência positiva de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos *Swiss* imunocomprometidos pela utilização de CF foi demonstrada por Salva et al. (2014). Nesse estudo foi observado valores de leucócitos e neutrófilos maiores nos grupos tratados com *Lactobacillus*. No entanto, outro estudo, também em modelo animal, mas com camundongos BALB-c, concluiu que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não teve efeito na modulação da imunossupressão induzida por CF (BUJALANCE et al., 2007).

Bacillus cereus var. Toyoi (*B. Toyoi*) é um probiótico relacionado à modulação do sistema imune (COPPOLA et al, 2005; SCHIERACK et al, 2007; SCHAREK et al,

2007a; SCHAREK et al, 2007b; ROOS et al, 2010). No estudo de CASTELLI (2011), em relação à imunidade humoral foi observado que a IgG do soro de camundongos BALB-c alimentados com esse probiótico apresentaram títulos estatisticamente superiores aos do grupo controle. Em outro estudo com porcas e leitões, onde *B. Toyoi* e *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) foram avaliados, somente a suplementação com o probiótico *B. Toyoi* levou a um claro aumento de IgA fecal nas porcas. Entretanto, os níveis de IgG nas porcas não foram afetados por nenhuma suplementação. Entre os leitões, os alimentados por *B. Toyoi* apresentaram níveis de IgA fecal significativamente maiores pouco antes do desmame, enquanto que no grupo que recebeu *E. faecium*, o nível mais alto ocorreu uma semana após o desmame (SCHAREK, 2007a).

Embora *B. Toyoi* apresente efeitos imunomoduladores, seu efeito sobre a imunossupressão e o estresse oxidativo induzidos pela quimioterapia com CF ainda não foram avaliados.

2 Justificativa

O tratamento quimioterápico, necessário para muitos pacientes com câncer, frequentemente apresenta consequências para o sistema imune e para outros parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo, acarretando, assim, um pior prognóstico. No entanto, sabe-se que a utilização de alguns probióticos pode auxiliar na modulação do sistema imune e em parâmetros de estresse oxidativo. A cepa *B. Toyoi* vêm sendo relacionada com a melhora da função imunológica. Entretanto, ainda não foi estudada a influência desse probiótico na neutropenia causada pelo tratamento quimioterápico. Além disso, ainda não foi estabelecido o efeito do *B. Toyoi* sobre as enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica na neutropenia induzida por CF. Portanto, acredita-se que a utilização de *B. Toyoi* pode melhorar a função imunológica, os parâmetros de estresse oxidativo e outros parâmetros bioquímicos dos animais estudados e, futuramente, melhorar a qualidade de vida e o prognóstico de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico com CF.

3 Referencial teórico

3.1 Impacto dos probióticos na neutropenia e no estresse oxidativo causados por tratamento quimioterápico

O sistema imune é responsável por defender o organismo de agentes infecciosos ou tóxicos. Os leucócitos, unidades móveis do sistema imune, são produzidos parte na medula óssea, como é o caso dos granulócitos, monócitos (células imaturas que mais tarde transformam-se em macrófagos) e alguns linfócitos, e parte no tecido linfoide (linfócitos e plasmócitos). Os granulócitos incluem três variedades celulares; neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os neutrófilos, juntamente com os macrófagos são os principais grupos celulares responsáveis pela destruição de agentes invasores (GUYTON & HALL, 2002).

O tratamento quimioterápico pode causar efeitos deletérios nesse sistema de defesa. A infusão de CF em camundongos albinos *Swiss*, mesmo em um regime simplificado de 250 mg.kg^{-1} , pode levar a uma redução de 84 % das células brancas sanguíneas, já na primeira dose de 150 mg.kg^{-1} , e levar a leucopenia, na segunda dose. Já os linfócitos podem reduzir 92 % no primeiro dia após a aplicação de CF e os monócitos, 96 % após a segunda dose. Em relação à contagem de neutrófilos, a neutropenia severa apresenta-se já na primeira dose de CF e se mantém nos dias seguintes (ZULUAGA et al., 2006).

No estudo de SALVA et al. (2014) foi demonstrado, em camundongos *Swiss*, que no terceiro dia após o tratamento com baixa dosagem de CF (150 mg.kg^{-1}) os leucócitos chegaram ao seu menor valor. Quanto aos neutrófilos, houve redução significativa entre os dias dois e seis após a administração de CF. Na medula óssea, foi verificada diminuição significativa na contagem total de células.

Em outro estudo realizado com camundongos, que utilizou um protocolo de tratamento com 100 mg.kg^{-1} de CF, verificou-se que, após a quimioterapia, ambos os grupos ficaram severamente neutropênicos, quando comparados ao grupo controle que não recebeu o tratamento com CF, e que o número de linfócitos e leucócitos totais também diminuíram, sem diferenças nos grupos celulares nos dois grupos (FABER et al., 2011). Esses resultados demonstram o potencial de imunossupressão da CF e

confirmam que protocolos com baixa dosagem de CF, além de serem mais simples, seguros e muito eficazes para modelos animais, são capazes de induzir neutropenia severa (ZULUAGA et al., 2006).

Salva et al. (2014) demonstraram a influência positiva de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos *Swiss* imunocomprometidos. Foi observado, em modelo animal de imunossupressão, valores de leucócitos maiores nos grupos tratados com *Lactobacillus*, e retorno aos valores normais um dia antes do que o grupo que não recebeu probióticos. Além disso, os valores de neutrófilos dos grupos que receberam probióticos também foram significativamente maiores do que os do grupo controle (SALVA et al., 2014). No entanto, outro estudo realizado com camundongos BALB-c concluiu que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não teve efeito na modulação da imunossupressão induzida por CF (BUJALANCE et al., 2007) e Liboredo et al. (2010) faz uma ressalva referente ao uso de alguns probióticos em condições debilitantes, pelo risco de translocação bacteriana e mortalidade.

Além de alterações no sistema imune, a CF causa alterações nos parâmetros de estresse oxidativo (TRIPATHI & JENA, 2010; ABRAHAM et al., 2011; PATRA et al., 2012; DIAZ-MONTERO et al., 2012). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os fatores antioxidantes e pró-oxidantes, com predomínio dos pró-oxidantes (radicais livres). Para manter o estresse oxidativo dentro dos níveis fisiológicos, existe o sistema de defesa antioxidante, o qual é essencial para impedir os danos oxidativos e consequentemente os danos sistêmicos gerados pelos radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Foi observado em ratos que o tratamento com CF induziu um aumento do biomarcador de oxidação lipídica malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, e reduziu a glutathiona reduzida (GSH). Além disso, aumentou significativamente o dano ao DNA (TRIPATHI & JENA, 2010).

Um estudo realizado com ratos que avaliou a hepatotoxicidade induzida por CF, demonstrou que houve uma redução da atividade enzimática antioxidante da superóxido dismutase (SOD), da catalase (CAT), da glutathiona peroxidase (GPx) e da glutathiona-S-transferase (GST), além de aumento de biomarcadores de estresse oxidativo, como o MDA e o óxido nítrico. Ainda ocorreu diminuição de GSH e aumento do nível de TNF- α (EL-SHEIKH & RIFAAI, 2014).

Patra et al. (2012) também demonstraram, em modelo animal com camundongos albinos Swiss, que a CF aumenta os níveis de MDA das células do fígado e da medula óssea, e reduz a atividade enzimática de GST e SOD de células da medula óssea. No entanto, nesse estudo foi observado um aumento da CAT de células hepáticas no grupo CF quando comparado ao controle.

O potencial antioxidante de probióticos vem sendo avaliado (OU et al., 2012; AMARETTI et al., 2013). Em um estudo com ratos, que avaliou o potencial antioxidante de diversas cepas de bactérias ácido-láticas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus thermophilus*) utilizadas concomitantemente, foi observado efeito na redução do estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico doxorrubicina (AMARETTI et al., 2013). Foi observado também que as bactérias ácido-láticas são capazes de reduzir o dano tóxico aos hepatócitos causados pelo tert-butil-hidroperóxido. Esse efeito protetor deve-se a redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e pela reativação de enzimas antioxidantes (OU et al., 2012). Já em um estudo realizado com pacientes oncológicos que buscou avaliar os efeitos dos probióticos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, e *Streptococcus salivaris* sobre parâmetros de estresse oxidativo, não foram encontradas mudanças significativas nesses parâmetros (EBRAHIMI- MAMEGHANI et al., 2013).

3.2 *Bacillus cereus* var. *toyoi*

O termo probiótico deriva do latim e do grego e significa “para a vida”(CARREIRO, 2013). Com o passar dos anos, diversos conceitos foram atribuídos a esse termo. Atualmente probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos e as bactérias patogênicas vivem em disputa constante por sítios de adesão e substratos no intestino humano. Por isso, uma microbiota saudável ajuda a impedir o crescimento de patógenos. Entre os diversos benefícios atribuídos aos probióticos pode-se destacar os seguintes: antagonismo à patógenos, estímulo à imunidade, ação anticarcinogênica, produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias e redução das pró-inflamatórias, além de prevenção e tratamento de diversas patologias (CARREIRO, 2013).

B. Toyoi é uma variedade de *Bacillus cereus* isolada do solo, não patogênica e não tóxica (WILLIAMS et al., 2009). As bactérias *Bacillus* são capazes de esporular, garantindo assim maior sobrevivência durante a digestão, como também no transporte e armazenamento do micro-organismo, sendo essa a sua principal vantagem em relação às bactérias ácido lácticas (GIL TURNES et al., 1999; HOA et al., 2000).

Embora já exista *B. cereus* comercializado para uso humano, *B. Toyoi* ainda é limitado para uso veterinário (CASTELLI, 2011). No entanto, a segurança do uso de *B. Toyoi* em humanos já foi avaliada no estudo de Ishioka (1979), no qual foi realizado um ensaio clínico com homens saudáveis durante oito dias de administração do produto a uma concentração de 6×10^{10} esporos da bactéria viável ao dia e não foram observados efeitos adversos.

Alguns estudos associaram esse probiótico à maior soroconversão na resposta sorológica à vacina contra parvovirose canina em camundongos BALB-c (COPPOLA et al., 2005) e na resposta sorológica à vacina contra o herpesvírus bovino tipo-5 em cordeiros (ROOS et al., 2010).

Outro estudo que avaliou a resposta imune de leitões vacinados observou menor percentual de células T CD8+ no grupo probiótico e maior razão CD4+/CD8+ (resposta imune secundária) no grupo probiótico do que no grupo controle. Entre os

animais não vacinados, o grupo probiótico produziu mais IL-4 e IFN- γ do que o grupo controle. Foi sugerido que o *B. Toyoi* pode irritar a mucosa intestinal resultando na ativação do sistema imune da mucosa (SCHIERACK et al, 2007). O consumo de *B. Toyoi* também foi relacionado à maior frequência de células T duplo-positivo CD3/CD8 do epitélio do jejuno proximal e foram encontrados mais linfócitos CD25+ e Células T $\gamma\delta$ nos tecidos de leitões do grupo probiótico (SCHAREK et al., 2007b).

Além disso, Castelli (2011) observou efeito sinérgico de *Saccharomyces boulardii* e *B. Toyoi* sobre a imunomodulação em camundongos BALB-c imunizados com proteína internalina A recombinante de *Listeria monocytogenes*, pois os soros do grupo em que os probióticos foram administrados de forma associada apresentaram o maior título, estatisticamente superior aos dos demais grupos.

O potencial antioxidante de probióticos também vem sendo avaliado (OU et al., 2012). Um estudo avaliou o efeito do probiótico *B. Toyoi* sobre os parâmetros de estresse oxidativo em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina demonstrou que o nível do marcador de estresse oxidativo TBARS foi menor no grupo suplementado com *B. Toyoi*. Além disso, foi demonstrado também que *B. Toyoi*, em camundongos diabéticos, reduziu os níveis de glicose e triglicerídeos sanguíneos. Assim, foi sugerido que o probiótico *B. Toyoi* apresenta atividade antioxidante e protege animais diabéticos contra o estresse oxidativo (BAMPI, 2015).

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com o probiótico *B. Toyoi* sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a segurança da utilização do probiótico *B. Toyoi* em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*, através da avaliação da ocorrência de translocação do probiótico para outros órgãos e da análise histopatológica do intestino, fígado e rins dos animais;
- Avaliar o efeito do probiótico *B. Toyoi*, em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*, sobre:
 - O peso e a ingestão alimentar;
 - O hemograma completo;
 - Os parâmetros bioquímicos aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e glicose;
 - A peroxidação lipídica no fígado, cérebro e rins, através da determinação dos níveis de TBARS e de tiol não protéico;
 - A atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx no fígado, cérebro e rins;
 - Os níveis de IgA intestinal;
 - Os níveis de expressão das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 e IFN- γ ;

5 Hipóteses

- O *B. Toyoi* é um probiótico seguro para utilização em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*;
- Os animais que receberem o probiótico *B. Toyoi* apresentarão maior ingestão alimentar e conseqüentemente menor perda de peso;
- O probiótico *B. Toyoi* será capaz de modular o sistema imune, aumentando os níveis das células de defesa;
- Os animais que receberem o probiótico *B. Toyoi* apresentarão menores níveis de AST, ALT, uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, glicose e maior nível de colesterol HDL;
- O probiótico *B. Toyoi* reduzirá a peroxidação lipídica;
- O probiótico *B. Toyoi* aumentará a expressão das enzimas antioxidantes CAT, SOD E GPx;
- O probiótico *B. Toyoi* aumentará a expressão da IgA instestinal;
- O probiótico *B. Toyoi* estimulará a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL 10 e reduzirá os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL17 e IFN- γ .

6 Revisão de literatura

Foi realizada busca de artigos no Periódicos Capes, que indexa as seguintes bases de dados: Pubmed, Medline, Lilacs, Web of Science, Cochrane, Science Direct, Scopus, Scielo, Google Acadêmico entre outros. Foram pesquisados artigos publicados nos últimos 10 anos, revisados por pares e não houve outros limites nas buscas. A busca de artigos também foi feita através de checagem de referências dos artigos consultados. Foram utilizados os seguintes descritores (DeCS/MeSH): Chemotherapy; Neutropenia; Probiotics; Cyclophosphamide; Biological assay; Mouse; Immunity; Immune system; Neoplasms; Cancer; *Bacillus cereus* toyoi; oxidative stress.

Tabela 1: Principais artigos selecionados na busca bibliográfica.

Título e Autor/ Revista e ano	Local	Delineamento	Amostra	Principais Resultados
Neutropenia induced in outbreed mice by a simplified low dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious disease. Zuluaga, A.F. et al. BMC infectious disease, 2006.	Medellín, Colômbia.	Os camundongos receberam tratamento com ciclofosfamida na dosagem de 250mg/kg (menor que a usual), sendo a primeira dose de 150mg/kg e a segunda de 100mg/kg no 4º dia, com o objetivo de induzir a neutropenia.	15 camundongos albinos Swiss.	<u>Leucócitos totais</u> - no 4º dia antes da segunda dosagem houve uma redução de 84%, no entanto a Leucopenia foi alcançada no 5º dia após a segunda dose. <u>Neutrófilos</u> - no 4º dia, após a segunda dosagem ocorreu neutropenia severa. <u>Linfócitos e Monócitos</u> - no 5º dia houve uma redução de 92% e 96% respectivamente.
Effect of <i>Saccharomyces boulardii</i> and <i>Bacillus cereus</i> var. toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. Coppola, M.M. Conceição, F.R. Gil-Turnes,C. Food and Agricultural Immunology, September 2005.	Pelotas, Brasil.	Os camundongos foram vacinados com tetravalente contra <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) e vacina contra parvovirose canina e divididos em 3 grupos. Grupo 1- não suplementado. Grupo 2- <i>Saccharomyces boulardii</i> . Grupo 3- <i>Bacillus cereus</i> var. toyoi.	36 camundongos BALB-c.	<u>Resposta sorológica à tetravalete contra <i>E. coli</i></u> - a soroconversão foi maior no grupo suplementado do que no controle. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo <i>S. boulardii</i> (1,6-1,8 vezes maior no grupo 2). <u>Resposta sorológica à vacina contra parvovirose canina</u> - a soroconversão foi maior no grupo suplementado do que no controle. Houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo <i>B. cereus</i> var. toyoi (6,8 a 9,1 vezes maior no grupo 3).

				Imunidade celular- grupo 2 estimulado com 1 e 10µgde proteína F4 de <i>E. coli</i> produziram 24 e 26 pg ml ⁻¹ de IL-4, respectivamente, mas não IFN-γ.
A probiotic strain of <i>Lactobacillus plantarum</i> stimulate lymphocyte response in immunologically intact and immunocompromised mice. Bujalance, C. et al. International Journal of Food Microbiology, 2007.	Granada, Espanha.	Os camundongos foram divididos em 4 grupos: Grupo 1- controle Grupo 2- <i>L. plantarum</i> Grupo 3- CF Grupo 4- <i>L. plantarum</i> + CF Os animais receberam os lactobacilos 10 dias antes da 1ª dose (150mg/kg- dia 0) de CF. A dosagem total de CF foi de 250mg/kg (dia 3).	6 camundongos BALB-c.	Não houve modificação significativa na contagem de leucócitos (sangue periférico) e esplenócitos entre os que receberam <i>L. plantarum</i> e o controle. No grupo <i>L. plantarum</i> + CF, esses parâmetros não foram alterados pelos probióticos. A restauração do sistema imune foi estatisticamente significativa no dia 1 e 11 após a última injeção de CF (corresponde ao dia 15 e 25 de tratamento com <i>L. plantarum</i>). A suplementação de <i>L. plantarum</i> em animais com o sistema imune intacto apresentou um leve aumento na resposta proliferativa de concanavalin A. O <i>L. plantarum</i> não teve efeito na supressão induzida por CF.
Impact of probiotic supplementation on mortality of induced 1,2- dimetilhidrazina carcinogenesis in a mouse model.	Minas Gerais, Brasil.	Os camundongos foram divididos em 10 grupos e foram realizados 2 experimentos: <u>Experimento 1:</u> Grupo 1- controle Grupo 2- controle com dimetilhidrazina (DMH). Grupo 3- Lacto (<i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	100 camundongos Swiss machos.	<u>Experimento 1:</u> <u>Mortalidade-</u> entre os animais não tratados com DMH, só houve uma morte (10%) no grupo Sb. Entre os animais tratados com DMH, houve mortalidade de 30% (Bifido), 40% (Lacto) e 60% (Lacto + Bifido), isso ocorreu em média 48 à 72h

Liboredo, J.C., et al. Nutrition, 2010.		Grupo 4- Lacto + DMH Grupo 5- Bifido (<i>Bifidobacterium animalis</i> var. lactis) Grupo 6-Bifido + DMH Grupo 7- Lacto + Bifido Grupo 8- Lacto + Bifido + DMH Grupo 9- <i>Saccharomyces boulardii</i> (Sb) Grupo 10- Sb + DMH Os probióticos começaram a ser administrados 1 semana antes do início da DMH (1 vez/ semana, por 6 semanas) ou injeção salina. <u>Experimento 2:</u> Grupos 4, 6 e 8. No dia da 1º injeção de DMH os animais não receberam probióticos.		após a 1º injeção de DMH). Não houve diferença significativa entre esses grupos. No grupo DMH e Sb + DMH não houveram mortes. <u>Translocação-</u> no grupo controle não houve translocação. Os grupos tratados com DMH e probióticos apresentaram translocação mais frequente e geralmente alta nos linfonodos mesentéricos. Nos grupos tratados somente com probióticos, os níveis microbianos nos tecidos foram baixos e restritos aos linfonodos mesentéricos e ao baço. Nos grupos DMH tratados ou não com probióticos a translocação alcançou o fígado e esse fenômeno foi mais intenso nos camundongos que receberam <i>L. delbrueckii</i> ou <i>B. latiss.</i> E a translocação no fígado foi significativa entre os grupos Bifido + DMH e controle, Lacto-Bifido e Sb. Provavelmente o aumento da translocação se deve à imunossupressão e ao aumento da permeabilidade da mucosa causada pela administração de DMH. <u>Experimento 2:</u> a interrupção da administração de probióticos no dia da primeira injeção de DMH preveniu a morte de camundongos durante o estudo.
--	--	---	--	--

Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. Mendonça, M.A.O, et al. Cancer Chemotherapy Pharmacology, 2005.	Uberaba, Brasil.	As mulheres participantes do estudo foram divididas em 2 grupos, grupo controle (25 mulheres saudáveis) e grupo de pacientes com câncer de mama (23 mulheres). Um dos quimioterápicos utilizado foi a ciclofosfamida, foram realizados 6 a 8 ciclos de quimioterapia, com intervalos de 21 dias. As pacientes foram entrevistadas sobre episódios de infecções bacterianas, confirmada por amostras de urina e/ou sangue e/ou radiografia de tórax. A coleta de sangue foi realizada no diagnóstico e antes do sexto ciclo de quimioterapia. Foram testados os seguintes quimiotáticos: N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP), Leucotrieno B4 (LTB4) e Interleucina-8 (IL-8). Foi comparada a resposta migratória dos neutrófilos entre os 2 grupos e na segunda parte do estudo foi avaliado o possível efeito supressor da quimioterapia na migração de neutrófilos.	48 mulheres com médias de idade semelhantes.	Os neutrófilos obtidos do grupo controle e das pacientes com câncer de mama apresentaram migração similar em resposta a todos os quimiotáticos testados. Das 23 pacientes, 16 realizaram quimioterapia. <u>Função quimiotática dos neutrófilos</u>- considerando o estágio da doença <ou = II (n=15) ou > ou = III (n=8) não houve diferença significativa na resposta migratória dos neutrófilos. <u>Efeito da quimioterapia na função quimiotática dos neutrófilos</u>- 2 pacientes se recusaram a participar da segunda fase do estudo (n=14). Foi observada significativa redução na quimiotaxia de neutrófilos para fMLP. 8 pacientes (57,14%) apresentaram um episódio de infecção entre os ciclos de quimioterapia (infecções do trato genito-urinário e/ou pneumonia), nesse grupo foi observada menor migração de neutrófilos para fMLP e LTB4, quando comparado à quimiotaxia antes do tratamento.
<i>Bacillus cereus</i> var. toyoi enhanced systemic immune response in piglets. Schierack, P. et al.	Berlim, Alemanha.	Os leitões foram divididos em 2 grupos: Grupo 1- suplementado com <i>Bacillus cereus</i> var. toyoi (n=34). Grupo 2- controle (n= 36)	70 leitões	Não houve diferença significativa de linfócitos e monócitos entre os vacinados e não vacinados. O percentual de células T CD8+ foi menor no grupo probiótico. O percentual de células T helper (CD4+), TcR1+, células B maduras (CD21+) e

Veterinary immunology and immunopathology, 2007.		20 animais do grupo 1 e 19 do grupo 2 foram designados aleatoriamente para vacinação da Influenza (n=39) e 14 animais do grupo 1 e 17 do grupo 2 para vacinação contra Micoplasma (n=31). O grupo vacinado contra Influenza teve o objetivo verificar produção de citocinas, proliferação de antígenos e estimulação policlonal e anticorpos. Já no grupo vacinado com Micoplasma foram verificados dados referentes a anticorpos. Nos animais vacinados foram avaliados a proliferação de antígenos específicos e de anticorpos contra o antígenos viral (influenza) e o antígeno bacteriano (micoplasma).		monócitos (CD14+) foram similares em ambos os grupos. O grupo probiótico apresentou maior razão CD4+/CD8+ (resposta imune secundária) do que o grupo controle. O grupo probiótico produziu mais IL-4 do que o controle (ambos não vacinados) e IFN-γ. Sugere-se que o <i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> pode irritar a mucosa intestinal resultando na ativação do sistema imune da mucosa.
Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia. Faber, J. et al. The Journal of Nutrition, 2011.	Utrecht, Holanda.	Os camundongos foram divididos em 3 grupos: Grupo 1.C: controle (n=10). Grupo 2. C-PT: dieta controle e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e quimioterapia com ciclofosfamida (n=20). Grupo 3. SNC-PT: combinação nutricional específica (SNC)* e <i>P. aeruginosa</i> e quimioterapia com CF (n=20). Para estabelecer a colonização com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> os camundongos foram pré-tratados com antibiótico de amplo espectro (ampicilina) nos dias -2,-1 e 0. Depois	50 camundongos fêmeas C3H/HeN	<u>Peso corporal e ingestão alimentar</u>: No começo do estudo o peso corporal dos animais foram semelhantes, a partir do 20º dia o grupo SNC-PT apresentou maior ganho de peso. Após a quimioterapia o peso dos 2 grupos declinou comparado com o grupo controle. Não houve diferença significativa na ingestão alimentar dos 3 grupos. <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>: No dia 13 a colonização por <i>P. aeruginosa</i> foi menor no grupo SNC-PT. Após o tratamento quimioterápico os níveis de <i>P.aeruginosa</i> na amostra de fezes diminuíram nos

		disso, os animais foram infectados por <i>P. aeruginosa</i> resistente à ampicilina no dia 0. A colonização por <i>P. aeruginosa</i> foi mensurado a partir das amostras fecais e a colonização intestinal foi obtida após 5 dias. No dia 6 os camundongos dos grupos com <i>P. aeruginosa</i> foram randomizados de acordo com o peso corporal e nível de colonização antes de começar a intervenção nutricional. Após 3 semanas de intervenção nutricional, foi induzida a neutropenia e o dano à mucosa através da quimioterapia. Nos dias 28 e 30 os animais receberam, ciclofosfamida, induzindo a disseminação da <i>P. aeruginosa</i> e a translocação sistêmica. Foi coletado sangue para determinar o grau de neutropenia. No dia 33, 5 dias após a primeira dose de quimioterapia foi coletado amostra de sangue para mensurar as citocinas pró-inflamatórias e estabelecer o estado de inflamação e neutropenia. Depois os camundongos foram mortos e foram retirados o fígado e o pulmão para determinação da translocação bacteriana nesses órgãos. A amostra do conteúdo intestinal foi obtida por lavagem de íleo e foi removido o conteúdo do ceco.	2 grupos, entre o 30º e 31º dia a colonização foi menor no grupo SNC-PT e o pH fecal também foi mais baixo no grupo SNC-PT no 7º e 31º dia e nos dias 28 e 33 foi encontrada maior quantidade de lactobacillus nas fezes do grupo SNC-PT comparado com o grupo C-PT. A redução do pH fecal pode ser devido à formação de butirato, acetato e lactato formados a partir da fermentação de oligossacarídeos (prebióticos). O baixo pH pode levar à inibição do crescimento e adesão de patógenos. <u>Neutropenia induzida pela quimioterapia:</u> Após o tratamento quimioterápico, os camundongos de ambos os grupos ficaram neutropenicos. O número de linfócitos e de células brancas totais diminuíram, não houveram diferenças nos tipos celulares dos dois grupos. <u>Translocação de <i>P. aeruginosa</i>:</u> A translocação bacteriana para o fígado foi menor no grupo SNC-PT do que no grupo C-PT e a translocação para o pulmão tendeu a ser menor também ($p=0,053$). C-PT: 3 mortes por infecção. SNC-PT <u>Citocinas plasmáticas e PGE2:</u> A concentração de citocinas foi maior no grupo C-PT do que no controle e tendeu a ser menor ainda no grupo SNC-PT ($p=0,10-0,38$), a variabilidade dentro do grupo pode ser responsável por a diferença não ser significativa. As citocinas proinflamatórias foram
--	--	--	--

		* SNC: elevada quantidade de proteína, L-leucina, óleo de peixe e oligossacarídeos específicos.		correlacionadas com a intensa translocação bacteriana no fígado.
Probiotics <i>Lactobacillus</i> strain protect against myelossuppression and immunosuppression in cyclophosphamide- treated mice. Salva, S. et al. International immunopharmacology, 2014.	Tucuman, Argentina.	Foram realizados 2 experimentos, todos os animais receberam CF e foram utilizadas duas cepas de <i>Lactobacillus</i> : <i>L. casei</i> e <i>L. rhamnosus</i> . Cada experimento teve 3 grupos, com 6 camundongos: Grupo 1: CF Grupo 2: Lc431 + CF Grupo 3: Lr1506 + CF Os grupos 2 receberam <i>L. casei</i> a partir do dia -2 e os grupos 3 receberam <i>L. rhamnosus</i> a partir do dia -5 até o dia 0, quando foi administrada uma dose intraperitoneal de 150mg/kg de ciclofosfamida. <u>Experimento 1</u> : avaliou a capacidade de proteger camundongos tratados com CF contra a mielossupressão e imunossupressão. <u>Experimento 2</u> : avaliou a capacidade dos probióticos para acelerar a recuperação da resposta imune contra o patógeno oportunista <i>Candida albicans</i> . Nesse grupo, além da metodologia citada anteriormente, os animais receberam também uma injeção intraperitoneal de <i>C. albicans</i> no 3º dia.	36 camundongos machos Swiss.	<u>Leucócitos</u> - apresentou o menor valor no 3º dia após a administração de CF e retornou ao valor normal no dia 8. Os grupos tratados com <i>Lactobacillus</i> apresentaram número de leucócitos sanguíneos similares ao grupo CF, no entanto no dia 3 esses valores foram maiores nos grupos tratados com probióticos, além disso retornaram aos valores normais um dia antes o que o grupo CF. <u>Neutrófilos</u> - diminuíram significativamente entre o dia 2 e 6 após a administração de CF. No dia 7 houve aumento de neutrófilos, ultrapassando os valores normais e no dia 17 esses valores retornaram ao normal. Só foram observadas diferenças entre os grupos nos dias 7 à 10 após a administração de CF, quando os valores dos grupos que receberam probióticos foram significativamente maiores que o controle. Na medula óssea o tratamento com CF induziu uma diminuição significativa na contagem total de células. <u>Fagócitos</u> - o menor valor foi observado no dia 3 e voltaram ao normal no dia 7 no grupo CF e no dia 5 nos grupos tratados com <i>Lactobacillus</i> . Os grupos

				que receberam probióticos apresentaram maiores valores do que o observado no grupo CF. Os grupos tratados com probióticos tiveram um aumento significativo na atividade dos macrófagos antes da administração de CF e mantiveram a atividade dos macrófagos e fagócitos maiores até o dia 10 após a administração de CF. <u>Células CD34 e Gr1-</u> em todos os grupos que receberam CF houve decréscimo das células Gr-1 do sangue e da medula óssea, chegando ao menor valor no dia 3 após a administração de CF. Os grupos tratados com <i>Lactobacillus</i> apresentaram maiores níveis de Gr-1. Ambos CD34 e duplo-positivo CD34/Gr-1 da medula óssea foram maiores nos animais tratados com <i>lactobacillus</i> antes (dia 0) e após (dia 3) da administração de CF (dia 0). <u>Resistência contra infecção por <i>C. albicans</i>-</u> o percentual de sobrevivência do grupo CF após 21 dias de infecção foi 40%, o grupo Lc431+CF e o Lr1506+CF foi de 70% e 60% respectivamente. Isso indica que camundongos apenas tratados com CF são mais suscetíveis a candidíase do que os que receberam também <i>lactobacillus</i>.
--	--	--	--	---

The changes induced by cyclophosphamide in intestinal barrier and microflora in mouse. Yang, J. et al. European Journal of Pharmacology, 2013.	Shangai, China.	Os animais e foram divididos em 4 grupos e depois receberam o quimioterápico por 5 dias: Grupo 1- controle. Grupo 2- 25 mg/kg de CF. Grupo 3- 50 mg/kg de CF. Grupo 4- 100 mg/kg de CF.	6 camundongos machos Balb/c.	<u>Efeitos do tratamento quimioterápico nas mudanças da microflora intestinal</u>- camundongos tratados com 100mg/kg de CF apresentaram um significante aumento de enterobacteraceae. <u>Efeitos do tratamento quimioterápico na permeabilidade intestinal</u>- camundongos tratados com 50 e 100mg/kg de CF apresentaram maior permeabilidade intestinal. <u>Efeito do tratamento quimioterápico na expressão de ocludina, ZO-1 e E-caderina</u>- o tratamento alterou a expressão dessas três principais proteínas do epitélio intestinal que formam as junções apertadas e as junções aderentes.
Influence of the probiotic <i>Bacillus cereus</i> var. toyoi on the intestinal immunity of piglets Scharek, L. et al. Veterinary immunology and immunopathology, 2007.	Berlim, Alemanha.	As 20 porcas foram inseminadas e divididas em 2 grupos, um tratado com o probiótico e outro não (grupo controle). As porcas foram suplementadas com <i>Bacillus cereus</i> var. toyoi a partir do dia 25 após a inseminação e seguiram recebendo a suplementação até a lactação. Os leitões do grupo tratado receberam o probiótico até o dia 28, após o desmame	20 porcas gestantes e seus filhotes.	<u>Epitélio do jejuno proximal</u>- a fração de leucócitos totais (CD45+) do epitélio jejunal superior foi similar em ambos os grupos de leitões. Todos os animais apresentaram um aumento no CD45+ intraepitelial entre os dias 14 e 56. A frequência de células T duplo-positivo CD3/CD8 da camada epitelial foram diferentes entre os grupos, foi maior no grupo probiótico no dia 28. <u>Lâmina própria mucosas</u>- embora a contagem de células CD45+ tenha sido maior no grupo probiótico, não houve diferença significativa entre os grupos. Embora tenha sido observada uma diferença significativa entre os grupos nas células CD25+ e linfócitos T $\gamma\delta$ na mucosa da lâmina

				própria. Análises quantitativas revelaram significativamente mais linfócitos CD25+ e Células T $\gamma\delta$ nos tecidos de leitões do grupo probiótico no dia 35. <u>Placa de Peyer (PP)</u>- Somente números baixos de células T foram detectadas na PP do íleo de ambos os grupos. A grande maioria de células na PP foi de CD21+, sem diferença significativa entre os grupos. <u>Frequência patogênica do sorogrupo <i>Escherichia coli</i></u>- foram encontradas em amostras de porcas de ambos os grupos. Os leitões do grupo controle abrigaram 7 dos 9 sorogrupos também encontrados nas porcas que consiste na transferência de contaminação de porca para leitão. Apesar de testados 19 leitões de cada grupo, apenas 2 dos 9 sorogrupos associados à patógenos foram isolados de amostras de leitões do grupo probiótico.
Effect of <i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi and <i>Saccharomyces boulardii</i> on the immune response of sheep to vaccines. Ross, T. B. et al. Food and Agricultural Immunology, 2010.	Pelotas, Brasil.	Os animais foram divididos em 3 grupos de 10, todos foram vacinados contra o herpesvírus bovino tipo-5 (BoHV-5) e <i>Escherichia coli</i>. Grupo 1: suplementado com <i>Bacillus cereus</i> var. toyoi. Grupo 2: suplementado com <i>Saccharomyces boulardii</i>. Grupo 3: controle.	30 cordeiros.	<u>Resposta sorológica à <i>Escherichia coli</i></u>- a soroconversão do grupo <i>S. boulardii</i> foi significativamente maior do que nos outros grupos. <u>Resposta sorológica à vacina BoHV-5</u>- a soroconversão do grupo <i>B. cereus</i> var. toyoi foi significativamente maior do que nos outros grupos, seguido do grupo <i>S. boulardii</i>.

Sinergismo dos probióticos <i>Saccharomyces boulardii</i> E <i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi sobre a imunomodulação em camundongos. Castelli, R. M. Dissertação de mestrado Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2011.	Pelotas, Brasil.	Para avaliar a resistência dos probióticos no trato gastrointestinal (TGI) de camundongos, os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo 1 (G1)- recebeu <i>S. boulardii</i> e <i>B. cereus</i> var. toyoi. Grupo 2 (G2)- recebeu somente <i>S. boulardii</i>. Grupo 3 (G3) – recebeu somente os esporos de <i>B. cereus</i> var. toyoi. A administração dos probióticos foi realizada em dose única por via oral através de gavagem. As fezes dos animais foram coletadas 24, 48 e 72h após a administração dos microorganismos e foram calculadas as taxas de sobrevivência dos probióticos individualmente e quando administrados juntos. Foi avaliada também a taxa de sobrevivência dos probióticos em condições simuladas ao TGI de humanos. Para avaliar o efeito imunomodulador da associação dos dois probióticos, os camundongos foram divididos em 4 grupos com 12 animais em cada. Grupo 1 (G1) – controle Grupo 2 (G2) – recebeu <i>S. boulardii</i>. Grupo 3 (G3) – recebeu esporos de <i>B. cereus</i> var. toyoi. Grupo 4 (G4) – recebeu <i>S. boulardii</i> e esporo de <i>B. cereus</i> var. toyoi.	63 camundongos BALB/c fêmeas	<u>Resistência dos probióticos associados às condições simuladas do TGI de humanos</u> - Ambos os probióticos apresentaram elevadas taxas de sobrevivência às (<i>S. boulardii</i>, em média 94,4% e <i>B. Toyoi</i>, em média 84,5%) e quando associados (<i>S. boulardii</i>, em média 92,2 % e <i>B. Toyoi</i>, em média 76,3%). <u>Resistência dos probióticos co-administrados ao TGI de camundongos</u> - Os probióticos <i>B. Toyoi</i> e <i>S. boulardii</i>, tanto administrados individualmente quanto associados, apresentaram elevadas taxas de sobrevivência 24 horas após a ingestão (<i>S. boulardii</i>, em média 64.4 % e <i>B. Toyoi</i>, em média 82.4%). Quarenta e oito horas após a ingestão, pode-se observar uma queda nessas taxas (<i>S. Boulardii</i>, em média 54.7 % e <i>B. Toyoi</i>, em média 51,8%). Porém, só observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nas taxas de sobrevivência entre os grupos após 72 horas, onde somente o probiótico <i>S. boulardii</i>, administrado tanto individualmente quanto associado, sobreviveu ao TGI dos camundongos (<i>S. boulardii</i> individualmente= 44.8 e associado a <i>B. Toyoi</i> = 31,5%). <u>Avaliação do efeito imunomodulador</u> <u>Imunidade humoral (IgG total)</u> - os soros dos animais pertencentes aos grupos alimentados com os probióticos apresentaram títulos estatisticamente superiores ($p < 0,05$) ao controle e
---	-------------------------	---	-------------------------------------	--

		Os camundongos tiveram quinze dias para adaptação à ração com probióticos e a receberam durante todo o experimento. No dia zero e 15, os animais foram imunizados via intramuscular com aproximadamente 3 µg da proteína internalina A recombinante (rInIA) de <i>L. monocytogenes</i> . Para a avaliação da resposta imune humoral, soros dos animais imunizados foram coletados nos dias zero (pré-imune) e 29 após a imunização.		que os soros do grupo em que os probióticos foram administrados de forma associada apresentou o maior título, estatisticamente superior ($p < 0,05$) aos dos demais grupos. <u>IgG1 e IgG2a</u> -os soros dos animais do grupo em que os probióticos foram associados apresentaram os maiores títulos de IgG1 rInIA específica, seguido pelos soros dos animais do grupo administrado somente com <i>S.bouardii</i> e com <i>B.Toyoi</i>. Entretanto, a diferença foi significativa no grupo onde os animais foram administrados de forma associada em relação aos outros ($p < 0,05$) <u>IFN-γ</u> - Não houve diferença significativa nas concentrações de IFN-γ entre os grupos.
Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative Stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes Tripathi, D.N; G.B. Jena, G.B Mutation Research, 2010.	Mohali, Índia.	<u>Avaliação do pré-tratamento</u> - Os ratos foram submetidos a um pré-tratamento com 25mg/kg de peso Astaxantina (AST) por 4 dias e no quarto dia receberam também uma dose de 50mg/kg de CF 1h após a AST. Todos os animais foram eutanaziados 24h após o tratamento com CF. Grupo 1 – controle. Grupo 2 – 4 dias de AST. Grupo 3 – apenas CF no dia 4. Grupo 4 – 4 dias d AST + CF. <u>Avaliação do pós-tratamento</u> – Os ratos receberam 25mg/kg de AST 10 dias após o tratamento com 50mg/kg de CF. Todos os	Ratos machos SD	<u>Efeitos da AST no estresse oxidativo induzido por CF</u> – O tratamento com CF induziu um aumento significativo no nível de MDA e reduziu o nível de GSH quando comparado ao grupo controle. A AST tanto como pré ou pós-tratamento reduziu o estresse oxidativo. <u>Efeitos da AST na ruptura de fragmentos de DNA</u> – O tratamento com CF induziu um aumento significativo no dano ao DNA. A AST reduziu o dano ao DNA. <u>Efeito da AST na fragmentação do DNA e apoptose</u>- O tratamento com CF induziu um

		animais foram eutanaziados 24h após o tratamento com AST. Grupo 1 – controle. Grupo 2 – 10 dias de AST. Grupo 3 – apenas CF no dia 1. Grupo 4 – CF no dia 1 + 10 dias de AST. Foram avaliados no fígado os níveis de marcadores de estresse oxidativo, como malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH), o dano ao DNA, as células em apoptose, a fragmentação do DNA, o dano celular. Foram estimados os focos de Glutathione-S-transferase-P (GST-P), a expressão das proteínas NQO-1, HO-1, p53 e p38 e estimativa de Nrf-2.	aumento na fragmentação do DNA. A AST induziu uma redução na fragmentação do DNA. <u>Efeito da AST no focos positivos de GST-P no fígado</u> – A indução de focos de GST-P é considerada um biomarcador precoce de hepatocarcinogênese. Foi encontrado no grupo tratado com CF um significativo aumento no número de hepatócitos positivos para GST-P, nos focos positivos e nos focos positivos por cm². A AST pós-tratamento induziu uma diminuição significativa no número de focos positivos de GST-P e nos focos por cm². <u>Efeito da AST na expressão de Nrf2 e associação com enzimas de proteção fase II NQO-1 e HO-1</u> – A AST induziu um aumento no nível nuclear de Nrf-2 e na associação com enzimas de proteção fase II NQO-1 e HO-1. <u>Efeito da AST na expressão de p53 e p38</u> – O tratamento com CF aumenta a expressão de p53 e p38 quando comparado ao controle. A AST pré-tratamento induziu uma significativa redução de p53 e p38 quando comparado ao grupo CF.
--	--	---	---

The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress Diaz-Montero, M. C. et al. Free Radical Biology & Medicine, 2012.	Miami, EUA.	Os animais foram divididos em 3 grupos, com no mínimo 3 e no máximo 5 animais. <u>Grupo 1</u>- controle. <u>Grupo 2</u>- CF (200mg/kg no dia 0). <u>Grupo 3</u>- CF + NOV-002 (25mg/kg de NOV-002 por até 7 dias, começando no dia anterior a CF). Nos dias 3 e 7 os animais foram eutanaziados. Foram avaliadas espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelas células-tronco hematopoiéticas da medula óssea e pelas células supressoras derivadas de mielóides, a razão glutathione reduzida/ glutathione oxidada e a expressão de RNAm de enzimas antioxidantes de células-tronco progenitoras hematopoiéticas, entre outros parâmetros.	Camundongos machos C57BL/6 (Ly5.2)	O tratamento com NOV-002 reduz as células tronco progenitoras hematopoiéticas e reverteu a imunossupressão de células supressoras, o que conduziu a uma melhora significativa das funções imunológicas e hematopoiéticas. Esses efeitos do NOV-002 podem ser atribuídos a capacidade de modulação do redox celular. O NOV-002 regula a expressão de superóxido dismutase 3 e glutathione peroxidase 2 em células tronco progenitoras hematopoiéticas, inibiu o aumento de espécies reativas de oxigênio produzidas por essas células e células supressoras derivadas de mielóides. Atenuou a redução da razão glutathione reduzida/glutathione oxidada nos esplenócitos. O NOV-002 reduz a supressão imune e hematopoiética causada pela ciclofosfamida.
Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. Patra, K. et al. Chemico-Biological Interactions, 2012.	Kolkata, Índia.	Os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1: controle. Grupo 2: camundongos tratados com várias doses de ácido cianâmico (AC). Grupo 3: camundongos tratados com CF. Grupo 4: camundongos tratados com CF e AC. A CF foi administrada intraperitonealmente na dosagem de 50 mg/kg. Já os animais tratados com AC receberam doses orais de 15, 30 e 60 mg/kg de AC, 15 dias antes da CF em dias	20 camundongos machos Swiss albino.	O AC reduziu a hipocelularidade da medula óssea e do baço, induzida pela CF e o estresse oxidativo da medula óssea e do fígado. Não houve diferença significativa nos valores de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) entre os grupos. <u>Peroxidação lipídica</u>- o grupo tratado com CF apresentou níveis significativamente maiores de malonaldeído (MDA), na medula óssea e no fígado, do que o grupo controle. O AC reduziu os níveis de MDA, de forma dose dependente.

		alternados. Os animais foram sacrificados 24h após a aplicação de CF.		<u>Enzimas antioxidantes</u> - as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione-S-transferase apresentaram elevação significativa no grupo tratado com AC, no entanto não foi dose dependente.
Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. Abraham, P. & Rabi, S. Redox Report, 2011.	Vellore, Índia.	Os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1: CF Grupo 2: AG + CF Grupo 3: AG Grupo 4: controle. Foi induzido o dano renal nos ratos através de uma única dose intraperitoneal de CF de 150 mg/kg. Foi realizada administração de 200 mg/kg de aminoguanidina (AG) uma hora antes da administração de CF. Todos os animais foram eutanasiados 16h após a administração de CF ou solução salina (no caso do grupo controle). Os rins foram utilizados para análise histológica e análises bioquímicas.	Ratos Wistar machos	O pré-tratamento com AG sozinho não afetou significativamente os parâmetros bioquímicos. O MDA foi 52% maior no grupo CF quando comparado ao controle e o AG atenuou essa elevação. A GSH foi 46% menor no grupo CF do que no controle e o AG restaurou completamente os níveis de GSH. As enzimas GPx e GST reduziram 27% e 35% respectivamente nos rins dos animais tratados com CF quando comparados ao controle e o AG restaurou quase completamente as atividades dessas enzimas. O nível de catalase foi 29% menor nos rins dos animais do grupo CF quando comparado ao controle e o AG restaurou completamente a atividade da catalase. O pré-tratamento com AG atenuou o dano renal, preveniu a peroxidação lipídica, a oxidação proteica, a depleção da GSH reduzida e a redução

				da atividade de enzimas antioxidantes, incluindo GPx, catalase, GST e a atividade da mieloperoxidase (marcador da infiltração de neutrófilos). Foi concluído que o AG pode prevenir o dano renal causado pela CF por inibição do estresse oxidativo.
Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative Stress from tert-Butyl Hydroperoxide Ou, C. et al. Journal of Food and Drug Analysis, 2012.	Taichung, Taiwan.	O estudo investigou o dano oxidativo causado pelo tert-butil-hidroperóxido (t-BHP) nas células HepG2 (células presentes em hepatocarcinomas) e o efeito de extratos intracelulares e células mortas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> Lal2, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb23, <i>Bifidobacterium longum</i> B136 e <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> St28 sobre as células HepG2. Primeiramente foram utilizadas dosagens 1 mM, 1,5 mM e 3 mM de t-BHP e então foi selecionada a dosagem de 3 mM para o experimentos seguintes com bactérias ácido-láticas. As células foram tratadas com bactérias ácido láticas antes da exposição a t-BHP.	In vitro	O dano tóxico aos hepatócitos causado por t-BHP foi atenuado pelas bactérias ácido-láticas, o efeito protetor ocorreu por redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e reativação de enzimas antioxidantes.

Impact of the probiotic bacteria <i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 (SF68) and <i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. Scharek, L. et al. Archives of Animal Nutrition, 2007.	Berlin, Alemanha.	O estudo buscou avaliar a influência de duas bactérias probióticas (<i>E. faecium</i> e <i>B. Toyoi</i>) sobre o sistema imune de porcas e seus leitões. As 26 porcas foram divididas em 2 grupos, 1 que recebeu <i>E. faecium</i> e outro que serviu como controle. O mesmo delineamento foi utilizado um ano depois para segundo ensaio com 10 porcas no grupo que recebeu <i>B. Toyoi</i> e 10 no grupo controle. As porcas receberam suplementação com um dos dois probióticos no começo da gestação. O teor de IgA nas fezes e de IgG no sangue das porcas foi avaliado antes e depois do desmame. Os mesmos parâmetros foram avaliados nas fezes e sangue de leitões.	26 porcas	Em porcas somente a suplementação com <i>B. Toyoi</i> levou a um claro aumento de IgA fecal. Os níveis de IgG nas porcas não foi afetado por nenhuma suplementação. Entre os leitões, os alimentados por <i>B. Toyoi</i> apresentaram níveis de IgA fecal significativamente maiores pouco antes do desmame, enquanto que no grupo que recebeu <i>E. faecium</i> o nível mais alto ocorreu uma semana após o desmame. Em ambos os grupos, os níveis de IgG pós-desmame foram significativamente menores em comparação com os respectivos grupos controle.
--	--------------------------	---	------------------	---

Os artigos selecionados na revisão de literatura demonstram o potencial imunossupressor e oxidativo da CF. Em contra partida vem sendo observado o efeito positivo que alguns probióticos poderiam ter para reverter a imunossupressão e alguns parâmetros de estresse oxidativo causados por esse quimioterápico. A maioria dos estudos que relacionam probióticos com resposta imune, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes foi realizado com bactérias ácido-láticas e em diversas condições, sendo raramente relacionado à quimioterápicos. O probiótico *B. Toyoi* foi pouco utilizado nesses estudos e foi mais relacionado à imunidade humoral, apresentando resultados positivos.

7 Material e Métodos

7.1 Probiótico e condições de cultivo

O micro-organismo *B. Toyoi* que será utilizado nesse trabalho será proveniente do banco de micro-organismos do Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPEl).

A bactéria liofilizada será suspensa em solução salina estéril, semeada em placas contendo Ágar Sangue e as placas incubadas por 24 h à 37°C. A seguir, 50 µL de uma suspensão contendo 3 a 5 colônias serão adicionados a 70 mL de caldo Infusão de cérebro e coração (BHI) e o cultivo será incubado em agitador orbital a 200 rpm, por 37 °C por 16 a 18 h. Após, 70 mL do inóculo serão adicionados a 700 mL de caldo NYSM (YOUSTEN, 1984) e o cultivo será incubado a 37°C sob agitação de 200 rpm durante 24 h.

A suspensão será aquecida em banho-maria a 80 °C durante 15 minutos para eliminar formas vegetativas do bacilo. O cultivo será centrifugado a 4000 g por 15 minutos, sob refrigeração de 4°C, e concentrado a um volume de 700 mL. A concentração de *B. Toyoi* será determinada através da diluição em série decimal do cultivo em solução salina (NaCl 0,9%) estéril e da contagem das UFC.mL⁻¹ em placas contendo Agar BHI, após a incubação das mesmas a 37°C por 24 h.

7.2 Animais e delineamento do estudo

Os ensaios biológicos serão desenvolvidos no Laboratório de Nutrifisiogenômica e Metabologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Serão utilizados 40 camundongos *Swiss* fêmeas com 45 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFPEl. Todos os animais receberão dieta padrão para roedores e água esterilizada. Os animais serão mantidos em gabinetes de 27x19x20 cm, produzida em arame de aço Inox Aisi 304 com polimento eletrostático, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300 mL com 5 camundongos por gabinete

em ambiente com temperatura de 22-24 °C e umidade relativa de 65-75 % com ciclos de luz e escuridão de 12 h.

Os animais serão randomizados e divididos em quatro grupos, cada um com 10 animais, da seguinte forma:

- Grupo controle (G1): receberão apenas ração e água esterilizada;
- Grupo CF (G2): receberão 250 mg/kg⁻¹ de CF;
- Grupo *B. Toyoi* (G3): receberão 10⁸ UFC.mL⁻¹ de esporos de *B. Toyoi*;
- Grupo CF + *B. Toyoi* (G4): receberão 250 mg/kg⁻¹ de CF e 10⁸ UFC.mL⁻¹ de esporos de *B. Toyoi*.

Os animais dos grupos 3 e 4 receberão suplementação diária de 10⁸ UFC.mL⁻¹ de esporos viáveis de *B. Toyoi* por gavagem. A suplementação com probiótico começará dez dias antes da primeira injeção de CF e continuará até o fim do estudo. E os animais dos grupos 2 e 4 serão imunossuprimidos por CF conforme descrito no item 7.3 (Figura 1).

Os animais sofrerão eutanásia no 17º dia de estudo. Previamente à eutanásia, os camundongos serão deixados em jejum de 6 horas, após serão anestesiados com pentobarbital, e em seguida submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O fígado, cérebro e rins serão removidos, pesados e envolvidos em papel alumínio, e depois congelados a – 70°C até o momento das análises. O intestino delgado será removido, o conteúdo intestinal será pesado e suspenso em PBS, utilizando 500 mg de conteúdo intestinal em 2 ml de PBS suplementado com um coquetel anti-protease.

A coleta de sangue ocorrerá no momento da exsanguinação, sendo uma parte do material coletado acondicionado em tubos heparinizados para as análises bioquímicas e de estresse oxidativo e outra parte adicionada a microtubos contendo 300 µL de EDTA para a determinação dos níveis de expressão de citocinas.

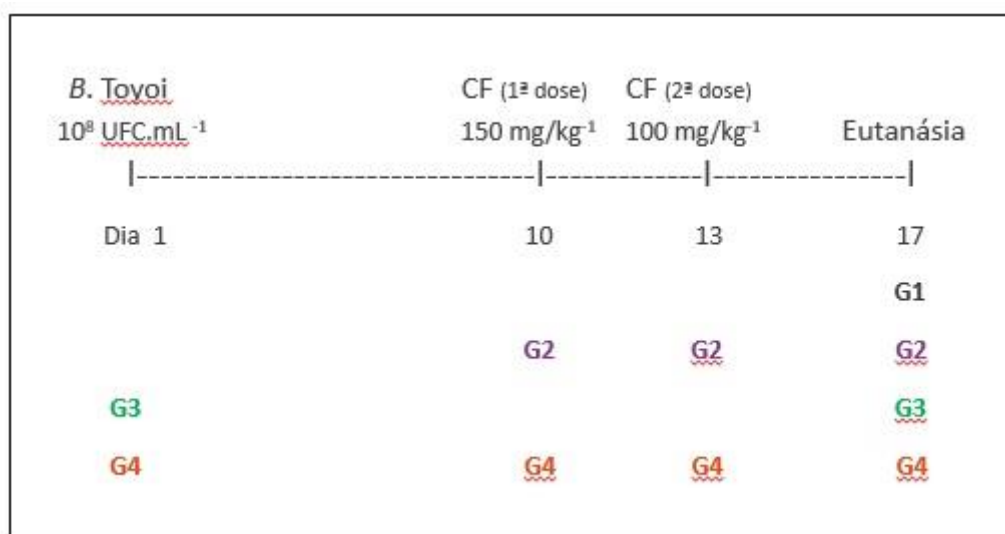


Figura 1: Delineamento do estudo.

7.3 Imunossupressão induzida por quimioterapia com CF

A imunossupressão induzida por CF será realizada de acordo com modelo previamente descrito (ZULUAGA et al., 2006). A infusão de CF será realizada por via intraperitoneal e o tratamento será realizado em dois momentos. A primeira dose de CF ocorrerá no dia dez do estudo, quando será aplicada em cada animal dos grupos CF uma injeção com 150 mg.kg⁻¹ de peso de CF. No dia treze, a segunda dose será aplicada com 100 mg.kg⁻¹, totalizando uma dosagem de 250 mg.kg⁻¹ de CF e então será realizado hemograma para verificar se os camundongos atingiram a neutropenia. Os níveis normais de neutrófilos para camundongos *Swiss* é de 110 a 2150 cells/mm³. Considera-se neutropenia quando esse valor é inferior a 100 cells/mm³ e neutropenia severa quando o nível de neutrófilos encontra-se abaixo de 10 cells/mm³ (ZULUAGA et al., 2006).

7.4 Avaliação da segurança da suplementação com *B. Toyoi* de camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF

Para avaliar a segurança da utilização de *B. Toyoi* em imunossuprimidos será avaliada a ocorrência de translocação do probiótico para outros órgãos, e amostras do intestino, fígado e rins dos animais serão submetidas à análise histopatológica.

7.5 Avaliação do efeito de *B. Toyoi* sobre o peso corporal, ingestão alimentar, hemograma completo e outros parâmetros bioquímicos em camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF

Todos os animais serão pesados diariamente para avaliar o ganho de peso e, para avaliar a ingestão alimentar, será pesada a quantidade de ração oferecida aos animais e posteriormente a quantidade que sobrou.

As análises bioquímicas de AST, ALT, uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e glicose serão realizadas utilizando-se kits comerciais. Será realizado hemograma completo onde será usada câmara de Neubauer e microscópio com lente objetiva de 100 X.

7.6 Avaliação do efeito de *B. Toyoi* sobre o estresse oxidativo em tecido hepático, cerebral e renal de camundongos *Swiss* imunossuprimidos com CF

7.6.1 Peroxidação lipídica (TBARS)

A formação de MDA, um índice de peroxidação lipídica, será determinada como descrito por Ohkawa et al. (1979). A reação consiste na mistura de duodecyl de sódio a 0,2 ml de 8,1%, 1,5 ml de 20% de ácido acético (ph 3.5), solução aquosa de 1,5 ml de 0,8% de ácido tiobarbiturico e 0,2 ml de plasma sanguíneo. A mistura será feita até 4 ml com água destilada e aquecida a 95° C durante 60 minutos. Após o arrefecimento do conteúdo sob água corrente, serão adicionados 5 ml de n-butanol e piridina (15: 01 v/v) e 1 ml de água destilada. O conteúdo será centrifugado a cerca de 16.000 x g durante 3 min. A camada orgânica será separada e a sua absorbância será determinada a 532 nm. As concentrações plasmáticas de MDA serão expressas como nmol.ml⁻¹.

7.6.2 Determinação de Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD será determinada como descrito por Klamt et al. (2002) e quantificada em 60 µg das amostras de cada tecido homogeneizado, as quais serão incubadas em 35 µL de tampão específico (pH=5,5) na presença de adrenalina a 37°C. A absorbância será monitorada por 60s em 480 nm pela taxa de inibição da reação auto-catalítica adrenocromo, em solução tampão contendo 1 mM de Madrenaline/50 glicina-NaOH (pH=10.2) / 1 mM catalase. O resultado será expresso em unidades de atividade de SOD por miligrama de proteína (U SOD.mg de proteína⁻¹, sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%).

7.6.3 Determinação da Catalase (CAT)

A atividade da CAT será determinada conforme descrito por Aebi (1984) que se baseia no acompanhamento da decomposição de H₂O₂ determinada espectrofotometricamente a 240 nm. As amostras de tecido homogeneizado serão incubadas em um tampão específico na presença de peróxido de hidrogênio. Serão centrifugados 300 µL das amostras, acrescentando-se 1 mL de tampão fosfato 14 mM com H₂O₂ (40µL) a 100 µL dos sobrenadantes. Absorbância será monitorada por 60 segundos a 240 nm. Os resultados serão expressos em unidades de atividade de CAT por miligrama de proteína (U CAT.mg de proteína⁻¹, sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 µmol de H₂O₂ por minuto por mg de proteína).

7.6.4 Determinação da Glutathiona peroxidase (GPx)

O conteúdo de glutathiona será determinado conforme o método descrito por Browne (1998). As amostras dos tecidos serão homogeneizadas em um tampão de fosfato de sódio (0,1 M, pH 8,0) contendo 5 mM EDTA e a proteína será precipitada com 1,7% de ácido meta-fosfórico. O sobrenadante será analisado com o-ftaldialdeído (1mg.mL⁻¹ de metanol) à temperatura ambiente durante 15 segundos. A fluorescência será medida utilizando excitação e

emissão de comprimentos de onda de 350 e 420 nm, respectivamente. Uma curva de calibração será realizada com soluções padrão de glutatona (0-500 μ M). As concentrações de GPx serão expressas como nmol.mg de proteína⁻¹.

7.7 Avaliação do efeito de *B. Toyoi* sobre os níveis de IgA secretória no intestino de camundongos Swiss imunossuprimidos com CF

Para quantificação da IgA secretória, os 500 mg de conteúdo intestinal suspensos em 2 ml de PBS suplementado com um coquetel anti-proteaseserá centrifugado a 2000 g por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante será coletado, recolhido e mantido congelado a -70°C até sua utilização. Os níveis de IgA em fluído intestinal serão avaliados por ELISA.

7.8 Avaliação do efeito de *B. Toyoi* sobre os níveis de expressão de citocinas em camundongos Swiss imunossuprimidos com CF

Amostras de mRNA serão extraídas das amostras de sangue em 300 μ L de EDTA utilizando o Kit RiboPure™ Blood Kit (AM 1928; Ambion[®]) e os níveis de expressão de IL-4, IL 10, IL-12, IL17 e IFN- γ serão determinados através da quantificação do mRNA por *Real-Time* PCR (qRT-PCR).

As reações de qRT-PCR serão realizadas no Stratagene[®] Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies, USA), utilizando o SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, UK). As condições de reação serão as seguintes: 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s e 72 °C por 60 s. Além disso, uma curva de dissociação será realizada a fim de assegurar a especificidade dos produtos amplificados. Todas as reações serão realizadas em triplicatas. O gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) será utilizado como normalizador dos dados de expressão dos genes alvo.

Os dados obtidos serão analisados utilizando o software REST[®] 2009 (*Relative Expression Software Tool*, Qiagen). A taxa de expressão genica

relativa será calculada em relação à expressão do GAPDH (PFAFFL et al., 2002).

7.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas serão realizadas através de ANOVA duas vias (efeito do probiótico, CF e interação probiótico vs. CF), usando o programa Graphpad Prism 6.0. Os dados serão apresentados como médias e desvio-padrão. Para todos os testes, será considerado nível de significância de 5%.

8 Resultados e Impactos esperados

Espera-se que os camundongos com neutropenia induzida por CF e suplementados com *B. Toyoi* apresentem melhora na função imune, nos parâmetros de estresse oxidativo e em outros parâmetros bioquímicos.

Acredita-se que os resultados desse trabalho terão impacto positivo no manejo dos efeitos tóxicos causados pela CF, o que futuramente poderá impactar diretamente na saúde do paciente oncológico submetido a tratamentos quimioterápicos, melhorando assim seu prognóstico e qualidade de vida.

9 Aspectos Éticos

O estudo passará pela aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e ocorrerá de acordo com os princípios éticos determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

10 Cronograma

Semestres de Estudo	2º semestre 2014	1º semestre 2015	2º semestre 2015	1º semestre 2016
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X
Qualificação do Projeto		X		
Envio ao Colégio Brasileiro de experimentação animal			X	
Trabalho experimental			X	
Análise dos Dados			X	
Redação			X	X
Defesa da Dissertação				X

11 Orçamento

Material	Quant.	Valor Unit. (R\$)	Total (R\$)
Micro tubo tipo Eppendorf 1,5 mL Pacote c/500	2	63,00	126,00
Ponteira Azul de 200 a 1000 uL Pacote c/1000 un.	2	34,90	69,80
Ponteira Amarela de 0 a 200 uL Pacote c/1000 un.	2	12,90	25,80
Luva de látex tam P Caixa c/100 un.	1	26,00	26,00
Água destilada Frasco c/1000 ml	1	6,50	6,50
Cyclophosphamide monohydrate Frasco c/ 250 mg	1	218,50	218,50
EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) Frasco c/1000mL	1	35,77	35,77
TCA (Ácido Tricloacético) Frasco 100 g	1	20,85	20,85
DTNB (ácido ditio nitrobenzóico) Frasco c/ 500 mg	1	97,00	97,00
KCL (Cloreto de Potássio) frasco C/ 500 g Frasco	1	17,12	17,12
SDS (Dodecilsulfato de Sódio) Frasco c/ 500 g	1	47,23	47,23
Ácido Acético Frasco c/ 1000 mL	1	19,04	19,04
TBA (Ácido Tiobarbitúrico) Frasco/100 G	1	1.489,14	1.489,14
Pirgalol Frasco c/ 500 mL	1	309,12	309,12
Triton Frasco c/ 1000 mL	1	175,00	175,00
K ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Dibásico) Frasco c/ 250 g	1	31,33	31,33
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de Potássio Monobásico) Frasco c/ 250 g	1	26,35	26,35
Análises bioquímicas	40	12,00	480,00
Total (R\$)	-----	-----	3220,55

Uma parte dos reagentes e materiais citados acima serão comprados com recursos do PROAP do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos-

PPGNA e o restante será fornecido pelo Laboratório de Imunologia Aplicada (CDTec- UFPel).

Referências

ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Redox report**, v. 16, n. 1, p. 8-14, 2011.

AEBI H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121- 126, 1984.

AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. **Applied microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 809–817, 2013.

BAMPI, Suely Ribeiro. **Avaliação da Atividade Antioxidante dos Probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. Toyoi**. 2015. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BROWNE, R. W., ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods in molecular biology**, v.108, p.347–52, 1998.

BUJALANCE, C.; MORENO, E.; JIMENEZ- VALERA, M.; RUIZ-BRAVO, A.A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. **International journal of food microbiology**, v. 113, p. 28–34, 2007.

CARREIRO, D. M. **Glúten, toxicidade, reações e sintomas**. 1. ed. São Paulo: Vida e consciência Ltda. 2013. 224 p.

CASTELLI, Regina Maria. **Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* E *Bacillus cereus* var. Toyoi sobre a imunomodulação em camundongos**. 2011. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2011.

CHEN, X.; FRUEHAUF, J.; GOLDSMITH, J. D.; XU, H.; KATCHAR, K. K.; KOON, H-W.; ZHAO, D.; KOKKOTOU, E. G.; POTHOUKAKIS, C.; KELLY, C. P. *Saccharomyces boulardii* Inhibits EGF Receptor Signaling and Intestinal Tumor Growth in *Apcmin* Mice. **Gastroenterology**, v. 137, p. 914–923, 2009.

COPPOLA, M. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; TURNES, C. G. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the humoral and cellular response of mice to vaccines. **Food and agricultural immunology**, v. 16, n. 3, p. 213- 219, 2005.

COPPOLA, M. M. & TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

DIAZ-MONTERO, C. M.; WANG, Y.; SHAO, L.; FENG, W.; ZIDAN, A. A.; PAZOLES, C. J.; MONTERO, A. J.; ZHOU, D. The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 1560–1568, 2012.

EBRAHIMI- MAMEGHANI, M.; SANAIE, S.; MAHMOODPOOR, A.; HAMISHEHKAR, H. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) in critically ill patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial (Pilot Study). **Pakistan journal of medical sciences**, v. 29, n. 2, p. 490-494, 2013.

EL-SHEIKH, A. A. K. and RIFAAI, R. A. Rifaai. "Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)-gamma Ligand, but Not PPAR-alpha, Ameliorates Cyclophosphamide- Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver." **PPAR Res.**2014. DOI: 10.1155/2014/626319.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature reviews clinical oncology**, v. 6, p. 638- 647.

FABER, J.; VAN LIMPT, K.; KEGLER, D.; LUIKING, Y.; GARSEN, J.; VAN HELVOORT, A.; VOS, A. P.; KNOLS, J. Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia. **The journal of Nutrition**, p. 1292-1298, 2011.

FAO/WHO Expert Consultation. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London: Ontario (Canada); 2002.

GIL-TURNES, C. et al. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 30, n.1, p.11-14, 1999.

GUYTON, A. C & HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 973 p.

HOA, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A; SMERTENKO, A; VAN, P. H; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.12, p.5241-5247, 2000.

Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Disponível em:
<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>> Acesso em: 31 março 2014.

Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:
<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento>> Acesso em: 15 junho. 2015a.

Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101> Acesso em: 15 junho. 2015b.

ISHIOKA, T. A. Preliminary clinical evaluation of safety of *Bacillus Toyoi* preparation (Toyocerin) in humans. Study Report. **Asahi Chemical Industry Co.,Ltd**, 1979.

KLAMT, F., et al., Time-related increase in mitochondrial superoxide production, biomolecule damage and antioxidant enzyme activities in cortical astrocyte cultures. **NeuroReport**, v.13, n.12, p.1515–1518, 2002.

LIBOREDO, J. C.; ANASTÁCIO, L. R.; MATTOS, L. V.; NICOLI, J. R.; CORREIA, M.I. T. D. Impact of probiotic supplementation on mortality of induced 1,2-dimethylhydrazine carcinogenesis in a mouse model. **Nutrition**, v. 26, p. 779–783, 2010.

MENDONÇA, M. O. A.; CUNHA, F. Q.; MURTA, E. F. C.; TAVARES-MURTA, B. M. Failure of neutrophil chemotactic function in breast cancer patients treated with chemotherapy. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 57, p. 663–670, 2006.

OKAWA, H. NOBUKO, A.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OU, C.-C.; CHIU, Y.-H.; LIN, S.-L.; CHANG, Y.-J.; HUANG, H.-Y.; LIN, M.-Y. Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative Stress from tert-Butyl Hydroperoxide. **Journal of food and drug analysis**, v. 20, n. 1, p. 101-110, 2012.

PATRA, K.; BOSE, S.; SARKAR, S.; RAKSHIT, J.; JANA, S.; MUKHERJEE, A.; ROY, A.; MANDAL, D. P.; BHATTACHARJEE, S. Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. **Chemico-biological interactions**, v. 195, p. 231–239, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.

REHMAN, M. U.; TAHIR, M.; ALI, F.; QAMAR, W.; LATEEF, A.; KHAN, R.; QUAIYOOM, A.; HAMIZA, O. O.; SULTANA, S. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 365, p. 119–127, 2012.

ROOS, T. B.; TABELÃO, V. C.; DUMMERB, L. A.; SCHWEGLER, E.; GOULART, M. A.; MOURA, S. V.; CORRÊA, M. N.; LEITE, F. P. L.; GIL-TURNES, C. Effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi and *Saccharomyces boulardii* on the immune response of sheep to vaccines. **Food and agricultural immunology**, v. 21, n. 2, p. 113- 118, 2010.

SALVA, S.; MARRANZINO, G.; VILENA, J.; AGÜERO, G.; ALVAREZ, S. Probiotic Lactobacillus strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. **International Immunopharmacology**, v. 22, p 209–221, 2014.

SCHAREK, L. et al. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. **Archives of Animal Nutrition**, v. 61, p. 223-234, 2007a.

SCHAREK, L.; ATHERR, B. J.; TÖLKE, C.; SCHIMIDT, M.F.G. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. *Toyoi* on the intestinal immunity of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 120, p. 136–147, 2007b.

SCHIERACK, P.; WIELER, L. H.; TARAS, D.; HERWIG, V.; TACHU, B.; HLINAK, A.; SCHIMIDT, M.F.G.; Scharek, L. *Bacillus cereus* var. *Toyoi* enhanced systemic immune response in piglets. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 118, p. 1–11, 2007.

TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. **Mutation Research**, v. 696, p. 69–80, 2010.

WAITZBERG, D. L. **Dieta, nutrição e câncer**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 783 p.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK G.A.; JIMÉNEZ, G.; CASTILLO, M. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *Toyoi* preparation. **Regulatory toxicology and pharmacology**, 236 – 246, 2009.

YANG, J.; LIU, K.; QU, J.; WANG, X. The changes induced by cyclophosphamide in intestinal barrier and microflora in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, p. 120-124, 2013.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Process**, v. 3, p. 315-343, 1984.

ZULUAGA, A. F.; SALAZAR, B. E.; RODRIGUEZ, C. A.; ZAPATA, A. X.; AGUDELO, M.; VESGA, O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. **BMC Infectious Diseases**, v. 55, p. 1-10, 2006.

Relatório do trabalho de campo

O início da parte experimental do trabalho atrasou devido a tramitações na comissão de ética, em seguida na parte prática também houve atrasos, devido a contaminações e à dependência de outros laboratórios para realização dos procedimentos.

Inicialmente o probiótico testado seria o *Bacillus cereus* var. Toyoi. No entanto o cultivo foi contaminado por duas vezes. Devido à centrífuga estar estragada e à falta de tempo de aguardar seu conserto, optou-se por utilizar a levedura *P. pastoris* no experimento.

O experimento começou pela produção da levedura *P. pastoris*, a fermentação foi realizada por três dias, posteriormente foi realizada as centrifugações, lavagem e plaqueamento com diluição seriada. Após esses procedimentos foi realizada a contagem de células viáveis (UFC).

O número de animais foi reduzido, devido a não ser possível realizar eutanásia em uma amostra de 40 animais, pois o laboratório em que realizamos a eutanásia não fazia mais do que 25 animais por dia, além disso tínhamos que nos encaixar nos dias disponíveis para isso.

Na parte de experimentação animal, aprendi a manipulação de camundongos, a realizar a gavagem e aplicar injeção intraperitoneal. Na eutanásia realizei retirada de órgãos, cortes histológicos e preparação e armazenamento de órgãos.

Não foi possível realizar todas as análises bioquímicas propostas no projeto, devido à pequena quantidade de sangue retirada dos animais. As análises das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx não foram realizadas por falta de reagentes necessários para o ensaio. Aprendi a realizar o ensaio de TBARS e os cálculos necessário para essa análise.

Outros testes, como nível de IgA secretória e citocinas não foram realizados devido ao pouco tempo disponível entre o desenvolvimento do experimento e a conclusão da dissertação.

Resumo

Efeito da levedura *Pichia pastoris* sobre o leucograma e a peroxidação lipídica em camundongos *Swiss* submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida

Introdução: Alguns probióticos são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro e reduzir o estresse oxidativo, propriedades importantes durante o tratamento antineoplásico com ciclofosfamida (CF), que tem como efeitos colaterais, o comprometimento da função de células do sistema imune, a indução do aumento de marcadores de estresse oxidativo e a ocorrência de danos renais e hepáticos. Estudos iniciais vêm demonstrando que a levedura *P. pastoris* (*P.p.*) possui propriedades probióticas. **Objetivos:** Avaliar a segurança da utilização da levedura *P. p* em imunossuprimidos, bem como seu efeito sobre o leucograma, o peso corporal e a peroxidação lipídica em um modelo de imunossupressão induzida por CF. **Material e método:** Foram utilizados 20 camundongos *Swiss* machos, divididos em quatro grupos: controle, controle CF (tratados com 250 mg.kg⁻¹ de CF), controle *P. p* (suplementados com 10⁹ UFC.mL⁻¹) e CF + *P.p.* Foram realizados leucograma, análise histopatológica, pesagem dos animais e ensaio de TBARS. **Resultados:** *P. p* mostrou-se segura, não causando mortes. Como esperado, a CF reduziu os níveis de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e causou lesões renais e hepáticas nos animais. Entretanto, *P. p* foi capaz de aumentar o número de leucócitos e neutrófilos dos animais imunossuprimidos e de reduzir a ocorrência lesões hepáticas. Além disso, *P. p* reduziu os níveis de espécies reativas ao TBA no rim e cérebro dos animais tratados com CF e no fígado e cérebro de animais saudáveis. **Conclusões:** Dessa forma, conclui-se que a levedura *P. p* demonstra um efeito protetor aos danos causados pela CF.

Palavras-chave: probióticos; perda de peso; patologia; leucócitos; peroxidação de lipídeos.

Abstract

Effect of yeast *Pichia pastoris* on leukogram and lipid peroxidation in Swiss mice submitted to chemotherapy with cyclophosphamide.

Introduction: Some probiotics are able to modulate the host immune system and to reduce oxidative stress is being observed in several studies. Important properties during the antineoplastic treatment with cyclophosphamide (CF), which has the effect of compromising the immune system's cell function, inducing increased markers of oxidative stress, and causing renal and hepatic damage. And initial studies have shown that *Pichia pastoris* (*P. p*) yeast possesses probiotic properties. **Objectives:** Evaluate the safety of the use of the *P. pastoris* yeast in immunosuppressed, as well as its effect on leukogram and lipid peroxidation in an CF induced immunosuppressive model. **Method:** Twenty male Swiss mice were used, divided into four groups: control, CF control (250 mg.kg⁻¹), *P. p* control (10⁹ CFU.mL⁻¹) and CF + *P. p*. Leukogram, histopathological analysis, animal weighing and TBARS assay were performed. **Results:** *P. p* was safe, not causing deaths. As expected, the CF reduced the levels of leukocytes, neutrophils and lymphocytes and caused renal lesions, and hepatics. However, *P. p* was able to increase the number of leukocytes and neutrophils of immunosuppressed animals and reduce the occurrence of hepatics lesions. Moreover, *P. p* reduced the levels of TBA reactive species in the kidney and brain of animals treated with CF and in the liver and brain of healthy animals. **Conclusions:** Therefore, It is concluded that *P. p* yeast demonstrates a protective effect to the damages caused by CF.

Key words: probiotics; weight loss; pathology; leukocytes; lipid peroxidation.

1 Introdução

Atualmente observa-se em diversos estudos o potencial dos probióticos, não apenas em regular a microbiota das mucosas, mas também em modular o sistema imune do hospedeiro, atuando diretamente no desenvolvimento e na regulação da imunidade de forma sistêmica, além de reduzir o estresse oxidativo^(1,2,3,4,5,6,7,8).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro⁽⁹⁾.

Esses benefícios, referentes à imunomodulação e ao estresse oxidativo são importantes principalmente em certos tratamentos, como a quimioterapia antineoplásica, que tem como consequências a imunossupressão e o aumento da peroxidação lipídica^(8,10,11,12). Um dos quimioterápicos comumente utilizados no tratamento do câncer é a ciclofosfamida (CF)⁽¹³⁾.

Dois estudos demonstraram que *P. pastoris*, uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, atualmente utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes, para a produção dos mais diferentes tipos de proteínas heterólogas⁽¹⁴⁾ principalmente visando a produção de vacinas^(15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27), possui alguns efeitos probióticos^(28,29). Estes estudos, realizados com animais concluíram que a levedura *P. pastoris* é inócua, é capaz de resistir à passagem através do trato gastrointestinal de mamíferos, de aumentar o ganho de peso e de melhorar a conversão alimentar dos animais, de aumentar a soroconversão contra *C. perfringens*, de inibir o crescimento de *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) *in vitro*, e de proteger camundongos da infecção por *S. Typhimurium*.

Diante desses achados promissores, considera-se *P. pastoris* uma levedura com potencial probiótico. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a segurança da utilização da levedura *P. pastoris* em imunossuprimidos, através de análises histopatológicas, bem como seu efeito sobre leucograma, peso corporal e peroxidação lipídica em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos Swiss.

2 Material e Métodos

2.1 Levedura e condições de cultivo

A levedura *P. pastoris* utilizada nesse trabalho foi proveniente do banco de micro-organismos do Núcleo de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). A levedura foi resuspensa em 10 mL de caldo Levedura, Peptona e Dextrose (YPD) e incubada por 24 h, a 28°C em agitador orbital a 200 rpm. Após, 10 mL do inóculo foram adicionados a 90 mL de caldo YPD e o cultivo foi incubado a 28°C sob agitação de 200 rpm, durante 24h. Finalizando o processo, 100mL de cultivo foi adicionado a 1,4 L de YPD e também incubado a 28°C sob agitação de 200 rpm, por 24h.

Após o processo fermentativo, as células foram recuperadas por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos e foram concentradas a um volume de 300 mL em solução salina 0,9% estéril sob refrigeração.

A concentração de *P. pastoris* foi determinada através de diluição seriada decimal em solução salina 0,9% estéril e as contagens foram realizadas em placas contendo Agar YPD expressas em UFC.mL⁻¹.

2.2 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 20 camundongos Swiss machos com 60 dias de idade, pesando entre 35-45 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos os animais receberam dieta padrão para roedores e água *ad libitum*. Os camundongos foram mantidos em gaiolas, com cinco animais por gaiola, em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e umidade relativa de 65-75 % com ciclo de 12 horas claro/escuro.

Os camundongos foram escolhidos de forma aleatória e divididos em quatro grupos, com cinco animais em cada:

- Grupo controle: os animais receberam solução salina 0,9% por via oral (sonda de gavagem);

- Grupo controle ciclofosfamida (CF): os animais receberam solução salina 0,9% por via oral (sonda de gavagem) e 250 mg.kg⁻¹ de CF;
- Grupo controle *P. pastoris* (*P.p.*): os animais receberam 10⁹ UFC.mL⁻¹ de *P. pastoris* por via oral (sonda de gavagem);
- Grupo CF + *P. pastoris* (CF + *P.p.*): os animais receberam 10⁹ UFC.mL⁻¹ de *P. pastoris* por via oral e 250 mg.kg⁻¹ de CF.

Os animais dos grupos *P. pastoris* receberam 10⁹ UFC.mL⁻¹ da levedura por via oral do primeiro dia até o fim do estudo.

A eutanásia foi realizada no 17º dia de estudo. Os animais foram anestesiados com isoflurano e o sangue foi retirado por punção cardíaca, seguindo os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (número do processo de aprovação no Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel - 23110.006974/2015-40). Para proceder as análises foram removidos fígado, rins e cérebro. Parte do fígado e rins foi mantida em formol 10% e encaminhada para análise histopatológica. A outra parte dos tecidos e o cérebro foi rapidamente homogeneizada em Tris/HCl 50 mM, pH 7,4 (1:10, m/v) e centrifugada a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi separado e utilizado para a realização do ensaio das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)⁽³⁰⁾. O sangue foi coletado no momento da punção cardíaca e acondicionado em tubos heparinizados para a realização do leucograma.

2.3 Tratamento quimioterápico com CF

A imunossupressão dos camundongos foi induzida utilizando CF, segundo protocolo previamente descrito por Zuluaga et al. (2006)⁽³¹⁾. No décimo dia do estudo foi administrada a primeira dose de 150 mg.kg⁻¹ de CF via intraperitoneal (i.p.). A segunda dose de 100 mg.kg⁻¹ foi aplicada no 13º dia de estudo, totalizando uma dosagem de 250 mg.kg⁻¹ de CF.

2.4 Avaliação da segurança da utilização da levedura *P. pastoris* em imunossuprimidos utilizando camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF

Para verificar a segurança da utilização de *P. pastoris* em imunossuprimidos, foi avaliada a ocorrência de mortes e de danos no fígado e nos rins dos camundongos através de análise histopatológica. Amostras de fígado e rim foram avaliadas quanto à presença de lesões no Núcleo de Biotecnologia do CDTec da UFPel.

2.5 Avaliação do efeito de *P. pastoris* sobre o leucograma de camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF

Para realização do leucograma foi utilizada câmera de Neubauer e microscópio com lente objetiva de 100 x e as análises foram realizadas no Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária da Faculdade de Veterinária da UFPel. As contagens das células (leucócitos, neutrófilos e linfócitos) foram expressas em células/mm³.

2.6 Avaliação do efeito de *P. pastoris* sobre o peso corporal em camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF

Os animais foram pesados no primeiro dia do estudo, no dia dez e no dia 16 do estudo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de variação de peso entre o dia dez e o dia 16 do estudo.

2.7 Avaliação do efeito de *P. pastoris* sobre a peroxidação lipídica (através de TBARS) em tecido hepático, renal e cerebral de camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF

Para a mensuração dos níveis de TBARS foi utilizado o método descrito previamente por Ohkawa et al. (1979)⁽³⁰⁾, o qual mensura os níveis do malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, que

reage com ácido tiobarbitúrico (TBA) e, em temperaturas elevadas forma um cromóforo rosa, que pode ser mensurado espectrofotometricamente a 532 nm. Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA.g⁻¹ de tecido.

2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias para variáveis contínuas, teste exato de Fisher seguido por teste de múltipla comparação para proporções para variáveis categóricase teste de Spearman para avaliar as correlações. Todos os resultados experimentais com variáveis contínuas foram expressos como média ± desvio padrão (S.D.) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Avaliação da segurança da utilização da levedura *P. pastoris* em imunossuprimidos utilizando camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF

A levedura *P. pastoris* não atuou como um micro-organismo oportunista, pois não causou mortes no grupo submetido à terapia com CF.

Quando avaliada a ocorrência de lesões renais, foi observada diferença significativa entre os grupos controle e CF e entre CF e *P. pastoris* ($p = 0,020$) (Figura 2A).

Em relação à ocorrência de lesões hepáticas foi possível observar diferença significativa entre os grupos controle e CF e entre CF e CF + *P. pastoris* ($p = 0,038$) (Figura 2B).

3.2 Avaliação do efeito da *P. pastoris* sobre o leucograma de camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF

A CF e a levedura *P. pastoris* apresentaram efeito significativo sobre o número de leucócitos totais ($p = 0,0014$ e $p = 0,0150$, respectivamente) e neutrófilos ($p = 0,0005$ e $p = 0,0079$, respectivamente). Foi observada interação significativa sobre o número de leucócitos totais ($p = 0,0401$) e de neutrófilos ($p = 0,0202$) (Figura 3A e 3B, respectivamente). Em relação ao número de linfócitos apenas a CF ($p = 0,0106$) teve efeito significativo (Figura 3C).

Foi observada correlação positiva e significativa entre o número de leucócitos e o de neutrófilos e linfócitos e entre a contagem dessas células e a variação de peso (resultados não apresentados).

3.3 Avaliação do efeito da *P. pastoris* sobre o peso corporal em camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF

Em relação à ocorrência de perda de peso foi observada diferença significativa entre os grupos controle e CF e entre CF e *P. pastoris* (Figura 4A).

Quando avaliada a porcentagem de variação de peso foi observada diferença significativa no grupo CF ($p = 0,0002$), reforçando assim o efeito do quimioterápico (Figura 4B).

3.4 Peroxidação lipídica

Foi observada interação significativa ($p = 0,0138$) sobre os níveis de TBARS entre a CF e *P. pastoris* no rim (Figura 5A) e no cérebro (Figura 5C). E *P. pastoris* apresentou efeito significativo ($p = 0,0008$ e $p = 0,0040$) sobre os níveis de TBARS no fígado (Figura 5B) e no cérebro (Figura 5C), respectivamente.

Pode-se observar também uma correlação positiva e significativa entre os níveis de TABRS no fígado e no cérebro.

4 Discussão

Na avaliação do leucograma foi observado que a CF reduziu significativamente o número de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos, como já observado na literatura⁽³¹⁾. Sendo assim foi possível confirmar a imunossupressão dos animais.

Foi visto também que a levedura *P. p* demonstrou ter um papel protetor aos efeitos da CF, pois foi capaz de aumentar significativamente o número de leucócitos e neutrófilos de camundongos saudáveis e tratados com o quimioterápico. No entanto, esse efeito protetor não foi demonstrado em outros estudos que utilizaram *Lactobacillus* ou a levedura *S. boulardii*. Em um estudo realizado com ratos Wistar saudáveis, que receberam 10^5 cél./ mL de *L. rhamnosus* por um período de 30 dias, não foi possível observar aumento significativo no número de leucócitos⁽³²⁾. Em outro estudo com camundongos com sistema imune intacto e imunossuprimidos com 250 mg.kg^{-1} de CF, foi demonstrado que o probiótico *L. plantarum* não foi capaz de reverter a imunossupressão causada pelo quimioterápico, nem de aumentar significativamente a contagem de leucócitos nos animais saudáveis⁽¹⁰⁾. Em outro estudo foi observado que um dia após o tratamento com 150 mg.kg^{-1} de CF, o número de leucócitos desse grupo foi semelhante aos grupos que receberam *L. rhamnosus* por cinco dias antes do quimioterápico e *L. casei* dois dias antes. Porém, no quarto dia após administração de CF, esses valores foram maiores nos grupos que receberam probióticos, embora não significativos. E no dia sete houve diferença significativa no número de neutrófilos, que foram maiores nos grupos que receberam probióticos⁽⁸⁾, enquanto que no presente estudo essa diferença já pode ser observada quatro dias após a segunda dose de CF. Da mesma forma, a levedura *S. boulardii* não foi capaz de prevenir a leucopenia em camundongos Swiss, causada por 5-fluoracil⁽³³⁾.

Em um estudo que utilizou dimetilhidrazina como indutor de carcinogênese em camundongos, foi observada uma mortalidade de 30% no grupo que recebeu *Bifidobacterium animalis* var. lactis, de 40% no grupo que recebeu *Lactobacillus delbrueckii* e de 60% no grupo que recebeu os dois probióticos. Já no grupo que recebeu a levedura probiótica *S. boulardii* não houve

mortes⁽³⁴⁾. A dosagem de todos os probióticos foi de 10^8 UFC. mL⁻¹, ou seja, dez vezes menor do que a utilizada no presente estudo. Da mesma forma que a levedura *S. boulardii*, *P. pastoris* não causou a morte de animais submetidos ao tratamento com CF, tão pouco em animais saudáveis, o que sugere que essa levedura é segura para suplementação de indivíduos saudáveis e imunossuprimidos em doses maiores do que a avaliada no estudo de França et al. (2015)⁽²⁹⁾. Quando avaliada a sobrevivência dos animais infectados por *S. Typhimurium* foi visto que os animais suplementados com *P. pastoris* por gavagem apresentaram uma taxa de sobrevivência de 50%, significativamente maior que a do grupo controle, no qual a taxa de sobrevivência foi de 20%. No experimento em que *P. pastoris* foi adicionada à ração, a taxa de sobrevivência foi de 80%, significativamente maior que a do grupo controle, que teve sobrevivência de 50%⁽²⁹⁾. É importante destacar que os efeitos dos probióticos dependem da cepa e da dose administrada.

O tratamento com CF causou lesões renais e hepáticas, como esperado e já observado na literatura ⁽¹²⁾. A ocorrência desse dano nos rins dos animais tratados com CF foi significativamente maior, quando comparada a dos grupos controle e *P.p.*, e embora o número de animais com lesões renais tenha sido menor no grupo CF + *P.p.* do que no grupo CF, essa diferença não foi significativa, talvez pelo tamanho da amostra. Já no fígado foi observada uma redução significativa da ocorrência de lesões em animais tratados com CF e suplementados com *P. pastoris*, o que sugere que a levedura pode prevenir o dano hepático causado pela CF. Alguns probióticos já foram relacionados com redução do dano hepático. Foi observado que, diante do dano hepático causado por acetaminofeno em ratos Wistar, o probiótico *Enterococcus lactis* demonstrou efeito protetor⁽³⁵⁾. Em outro estudo com ratos com injúria hepática foi observado que aqueles suplementados com *L. plantarum* isolado ou em combinação com arginina apresentaram redução significativa das alterações histológicas⁽³⁶⁾. No estudo de França et al. (2015)⁽²⁹⁾, com camundongos BALB/c infectados por *S. Typhimurium* que receberam 10^7 UFC.g⁻¹ de *P. pastoris* por 20 dias, ou seja, uma quantidade 10 x menor da levedura, foi demonstrado que esta não causou danos nas microvilosidades e morfologia intestinal.

Sabe-se que quimioterápicos como a CF aumentam o estresse oxidativo, como já visto em outros estudos^(11,12). Para auxiliar na redução do estresse oxidativo gerado por diversas causas, tem se utilizado probióticos ⁽³⁷⁾. Foi demonstrado que a administração de 5×10^7 ou 5×10^8 UFC de *Lactobacillus acidophilus* foi capaz de reduzir os níveis de MDA no sangue causados pela progressão da doença aterosclerótica em camundongos⁽³⁷⁾. Em camundongos BALB/c infectados por *Giardia* trophozoites que receberam *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) foi observada redução significativa dos níveis de MDA do homogenat ⁽³⁸⁾. Da mesma forma, no presente estudo a levedura *P. pastoris* foi capaz de reduzir os níveis de MDA no rim e cérebro dos animais tratados com CF. Já no fígado a *P. pastoris* reduziu a peroxidação lipídica apenas nos animais saudáveis. Não existem outros estudos que tenham avaliado o potencial antioxidante de *P. pastoris*.

Além dos danos já citados, a CF também é capaz de induzir a perda de peso em camundongos ⁽³⁹⁾. Esse efeito foi visto também no presente estudo. Entretanto *P. pastoris* não foi capaz de evitar a perda de peso causada pelo quimioterápico. Foi observado que a levedura *S.boulardii* tem o potencial de reduzir a perda de peso, quando aumentada a dose do probiótico para 16×10^9 e 48×10^9 UFC.kg⁻¹, em camundongos Swiss tratados com o quimioterápico 5-fluorouracil ⁽³³⁾.

No estudo de Gil de Los Santos et al. (2012)⁽²⁸⁾, o qual avaliou o ganho de peso em frangos de corte, observou-se que animais que receberam 1×10^6 g⁻¹ de células viáveis de *P. pastoris*, tanto na forma selvagem, como recombinante, contendo o gene da toxina α de *C. perfringens*, apresentaram ganho de peso superior ao grupo controle. Embora no presente estudo o mesmo não tenha ocorrido, é possível que se a dosagem de *P. pastoris* administrada fosse maior, a diferença entre os grupos que receberam CF se tornasse significativa, uma vez que os animais que receberam apenas CF não ganharam peso e aqueles que receberam também a levedura *P.pastoris* apresentaram ganho de peso.

Conclusões

Diante dos dados apresentados e dos resultados encontrados conclui-se que a levedura *P. pastoris* é segura e possui diversos efeitos probióticos. Além disso, foi capaz de estimular o sistema imune, reduzir os danos hepáticos e a peroxidação lipídica causados pela CF. Entretanto, sugere-se que novos estudos, com a mesma metodologia, sejam realizados.

Referências

1. Coppola MM, Turnes CG. Probióticos e resposta imune. Ciênc. Rural. 2004; 34 (4): 1297-303.
2. Schierack P, Wieler LH, Taras D, et al. *Bacillus cereus* var. Toyoi enhanced systemic immune response in piglets. Vet Immunol Immunopathol. 2007; 118: 1–11.
3. Scharek L, Guth J, Filter M, Schmidt MFG. Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. toyoi NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. Arch Anim Nutr. 2007a; 61: 223-34.
4. Scharek L, Atherr BJ, Tölke C, Schmidt MFG. Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. Toyoi on the intestinal immunity of piglets. Vet Immunol Immunopathol. 2007b; 120: 136–47.
5. Generoso SV, Viana ML, Santos RG, et al. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. European journal of nutrition. 2011; 50: 261–69.
6. Ou CC, Chiu, YH, Lin SL, Chang YJ, Huang HY, Lin MY. Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative Stress from tert-Butyl Hydroperoxide. J Food Drug Anal. 2012; 20 (1): 101-10.
7. Amaretti A, Di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bordoni, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. Appl microbiol Biotechnol. 2013; 97: 809–17.
8. Salva S, Marranzino G, Vilena J, Agüero G, Alvarez S. Probiotic *Lactobacillus* strains protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. Int Immunopharmacol. 2014; 22: 209–21.
9. FAO/WHO Expert Consultation. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London: Ontario (Canada); 2002.

10. Bujalance C, Moreno E, Jimenez- Valera M, Ruiz-Bravo A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int J Food Microbiol.* 2007; 113: 28–34.
11. Tripathi DN, Jena GB. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutat Res.* 2010; 696: 69–80.
12. Abraham P, Rabi S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Redox Rep.* 2011; 16 (1): 8-14.
13. Waitzberg DL. Dieta, nutrição e câncer. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 783 p.
14. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* 2000; 16: 23-52.
15. Sugrue RJ, Fu J, Howe J, Chan YC. Expression of the Dengue vírus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. *J Gen Virol.* 1997; 78: 1861-66.
16. Bisht H, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N. Expression and purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *Protein Expr and Purif.* 2001; 23: 84-96.
17. Wei H, Jiang L, Xue Y, Fanh D, Guo H. Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *P. pastoris*. *J Virol Methods.* 2003; 109:17-23.
18. Yadava A, Ockenhouse CF. Effect of Codon Optimization on Expression Levels of a Functionally Folded Malaria Vaccine Candidate in Prokaryotic and Eukaryotic Expression Systems. *Infect Immun.* 2003; 71 (9): 4961–69.
19. Valdés I, Hermida L, Zulueta A, et al. Expression in *Pichia pastoris* and immunological evaluation of a truncated Dengue envelope protein. *Mol Biotechnol.* 2007; 35: 23-30.

20. Canales M, De La Lastra JMP, Naranjo V, et al. Expression of recombinant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. BMC Biotechnol. 2008; 8 (14).

21. Dummer LA, Conceição FR, Nizoli LQ, et al. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J Virol Methods. 2009; 161 (1): 84-90.

22. Dummer LA, Nizoli LQ, Rocha ASR, et al. Production and characterization of recombinant bovine herpesvirus type 5 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris*. Vet Immunol Immunopathol. 2009; 128, (1-3): 315-16.

23. Nizoli LQ, Conceição FR, Silva SS, et al. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Rev Bras Parasitol Vet. 2009; 18 (2): 1-4.

24. Dummer LA, Araújo IL, Finger PF, et al. Immune responses of a mice against recombinant bovine herpesvirus 5 glycoprotein D. Vaccine. 2014; 32 (21): 2413-19.

25. Vianna AM, Gonçalves RA, De Lara APSS, Pinto LS, Nizoli LQ, Leite FPL. Heterologous expression of EMA-2 (equi merozoite antigen) of *Theileria equi* in *Pichia pastoris* with potential use in immunobiologics. Cienc Rural. 2014; 44 (10): 1830- 7.

26. Pinheiro AF, Borsuk S, Berne MEA, et al. Use of ELISA based on NcSRS2 of *Neospora caninum* expressed in *Pichia pastoris* for diagnosing neosporosis in sheep and dogs. Rev Bras Parasitol Vet. 2015; 24 (2): 148-54.

27. Siedler BS, Roloff BC, De Sá GL. et al. Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. Protein Expr Purif. 2017; 130: 21-27.

28. Gil De Los Santos JR, Storch OB, Fernandes CG, Gil-Turnes C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. Vet Microbiol. 2012; 156 (3-4): 448-51.

29. França RC, Conceição FR, Mendonça M, et al. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 7953–61, 2015.
30. Okawa H, Nobuco A, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95: 351-58.
31. Zuluaga AF, Salazar BE, Rodriguez CA, Zapata AX, Agudelo M, Vesga O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infect Dis*. 2006; 55: 1-10.
32. Narcizo J, Ximenez L, Sumita T, Santos S, Silvia C, Leao M. Influência do consumo de *Lactobacillus rhamnosus* nos níveis séricos de IgG e contagem de leucócitos de ratos SPF recém desmamados. *Revista Biociências*. 2014; 20 (1).
33. Justino PFC, Melo LFM, Nogueira AF, Costa JVG. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Br J Nutr*. 2014; 111: 1611–21.
34. Liboredo JC, Anastácio LR, Mattos LV, Nicoli JR, Correia MITD. Impact of probiotic supplementation on mortality of induced 1,2-dimethylhydrazine carcinogenesis in a mouse model. *Nutrition*. 2010; 26: 779–83.
35. Sharma S, Chaturvedi J, Bhushan P, Singh RL, KAKKAR, P. Probiotic *Enterococcus lactis* IITRHR1 protects against acetaminophen-induced Hepatotoxicity. *Nutrition*. 2012; 28: 173– 81.
36. Rishi P, Bharrhan S, Singh G, Kaur PI. Effect of *Lactobacillus plantarum* and L-arginine against endotoxin-induced liver injury in a rat model *Life Sci*. 2011; 89: 847– 53.
37. Chen L, Liu W, Li Y, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process. *Int Immunopharmacol*. 2013; 17: 108-15.
38. Goyal N, Rishi P, Shukla G. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. *World J Microbiol Biotechnol*. 2013; 29: 1049–57.

39. Faber J, Van Limpt K, Kegler D, et al. Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia. *J Nutr.* 2011; 1292- 98.

Figura 1 – após item 2.3

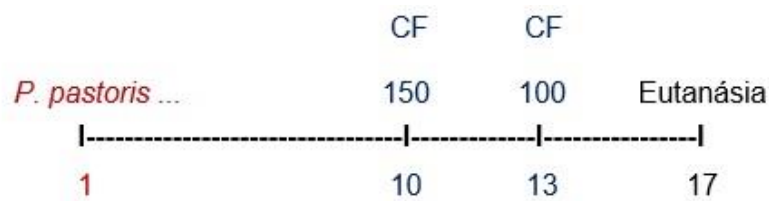
**Figura 1:** Delineamento do estudo.

Figura 2 – após item 3.1

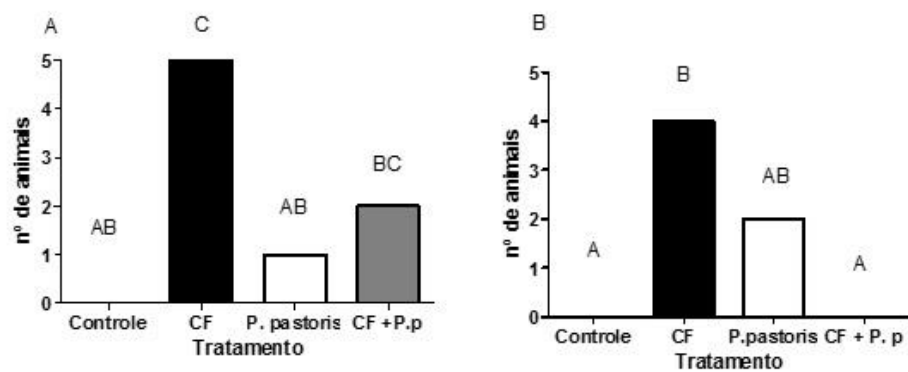


Figura 2. Número de animais com lesão renal (A) e hepática (B) no dia 17 (4 dias após a 2ª dose de CF), de camundongos *Swiss* não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de ciclofosfamida (CF), suplementados com 10⁹ UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* (*P. p*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P. p*). A CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média ± desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizado teste exato de Fischer seguido por teste de múltipla comparação para proporções. Letras diferentes representam diferenças significativas (p<0,05).

Figura 3 – após item 3.2

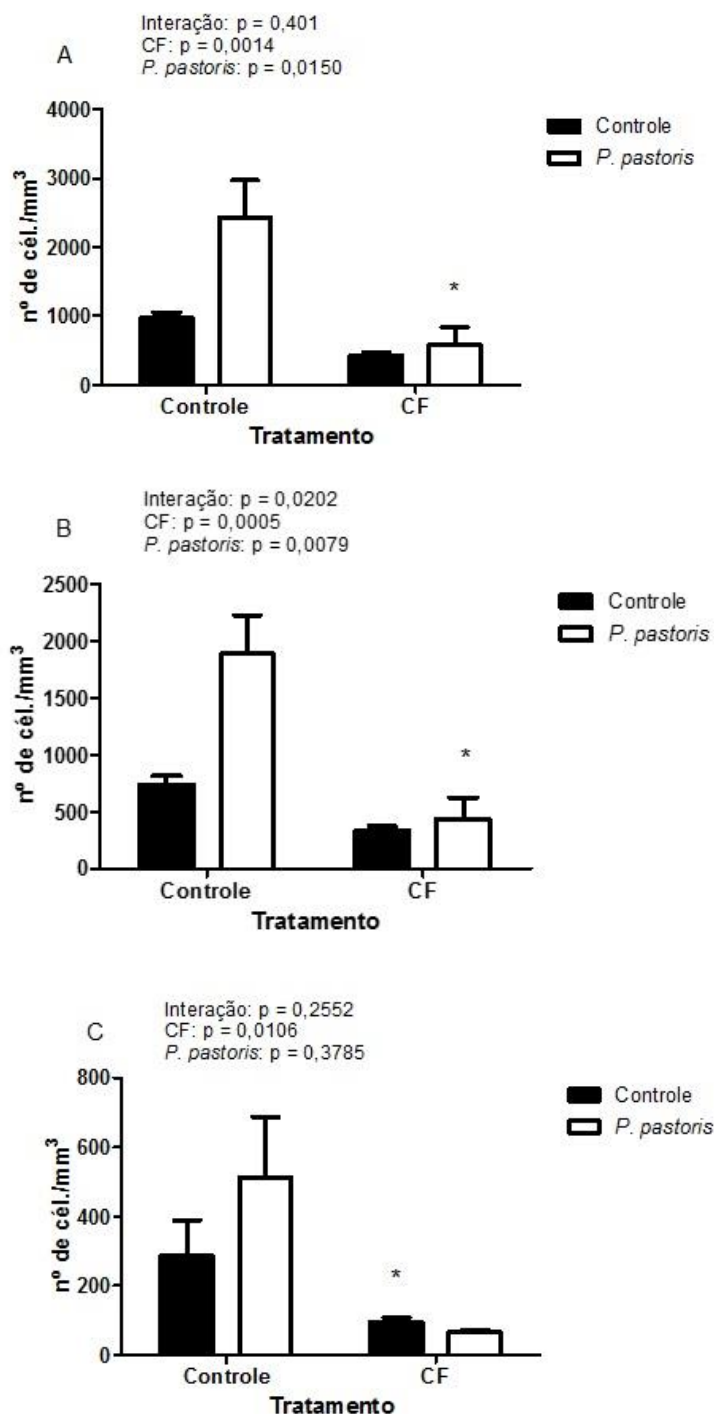


Figura 3. Número total (células/mm³) de leucócitos (A), neutrófilos (B) e linfócitos (C) no dia 17 (4 dias após a 2ª dose de CF) de camundongos Swiss não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de CF, suplementados com 10⁹ UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* (*P. p*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P.p*). A CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média $\pm$ desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizada ANOVA de duas vias. * $p < 0,05$.

Figura 4 – após item 3.3

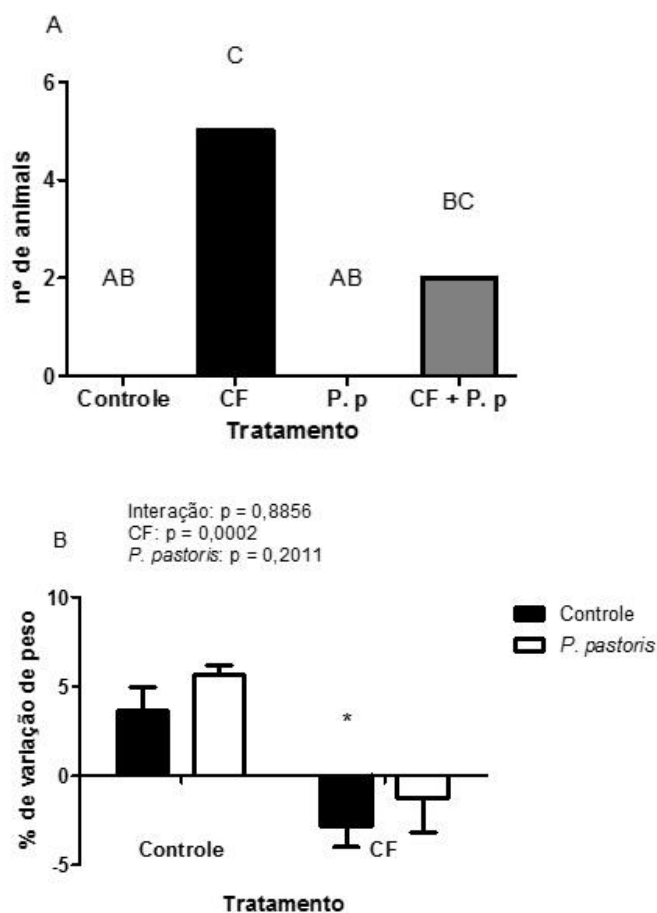


Figura 4. Número de animais que apresentaram perda de peso (A) e porcentagem de variação de peso (B) entre os dias 10 e 16, de camundongos *Swiss* não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de ciclofosfamida (CF), suplementados com 10⁸ UFC. mL⁻¹ *P. pastoris* (*P.p*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P.p*). A CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média ± desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizado teste exato de Fisher seguido por teste de múltipla comparação para proporções. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) (A) e ANOVA de duas vias, sendo * $p < 0,05$ (B).

Figura 5 – após item 3.4

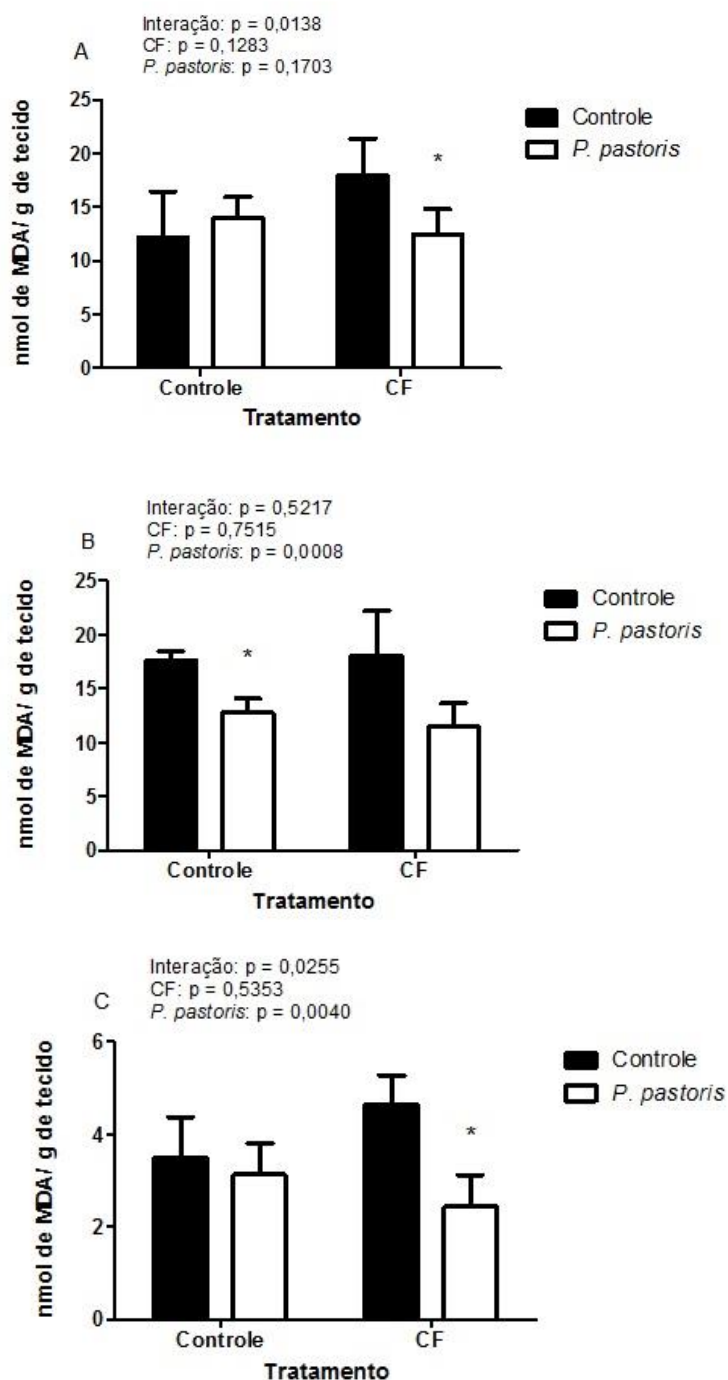


Figura 5. Níveis de TBARS (nmol de MDA/g de tecido) no rim (A), fígado (B) e cérebro (C) no dia 17 (4 dias após a 2ª dose de CF), de camundongos Swiss não tratados (controle), tratados com 250 mg.kg⁻¹ de ciclofosfamida (CF), suplementados com 10⁹ UFC. mL⁻¹ de *P. pastoris* (*P. p.*) e tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* (CF + *P. p.*). CF foi administrada em duas doses, nos dias 10 (150 mg.kg⁻¹) e 13 (100 mg.kg⁻¹), via intraperitoneal. A administração intragástrica de *P. pastoris* iniciou no dia um e continuou até o dia da eutanásia (dia 17). Os dados representados são a média ± desvio padrão dos resultados de 5 animais. Foi utilizada ANOVA de duas vias * $p < 0,05$.