UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

DENISE SAYURI CALHEIROS DA SILVEIRA

**Efeitos imuno-moduladores de *Lactobacillus bulgaricus* no
câncer colorretal associado à colite**

RIBEIRÃO PRETO

2017

Denise Sayuri Calheiros da Silveira

**Efeitos imuno-moduladores de *Lactobacillus bulgaricus* no
câncer colorretal associado à colite**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Silva Bisson

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Silveira, Denise Sayuri Calheiros

Efeitos imuno-moduladores de *Lactobacillus bulgaricus* no câncer colorretal associado à colite. Ribeirão Preto, 2017.

106 p.; il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Bisson, Gabriela Silva.

1. Probiótico, 2. Colite, 3. Câncer associado à colite, 4. Atividade antitumoral

FOLHA DE APROVAÇÃO

DENISE SAYURI CALHEIROS DA SILVEIRA

*“Efeitos imuno-moduladores de *Lactobacillus bulgaricus* no câncer colorretal associado à colite”*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Silva Bisson

APROVADA EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Gabriela Silva Bisson

Instituição: EERP/USP Ribeirão Preto Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura: _____

Prof. Dr.

Instituição: Assinatura: _____

*Para meu pai, minha mãe e meu irmão,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

Talvez só os mais próximos saibam. Talvez só aqueles que estiveram muito perto. Talvez só aqueles que tão de perto, passaram por esta experiência. Este trabalho exigiu-me mais do que dedicação, resiliência e coragem. Parece pouco, mas aqui está concentrado todos esforços do meu mundo. Por paixão me enfie até o pescoço, me rasguei, me achei, me perdi. Aqui estão minhas vísceras, meu sangue, minha pulsação, minhas lágrimas, meus risos, meus limites e meus transbordamentos. Aqui está a minha gratidão:

À Profa. Dra Gabriela Silva Bisson, que permitiu a liberdade desta pesquisa. Agradeço pela paciência, pelas palavras doces e pelos conselhos amargos. Agradeço pelo acolhimento, apoio e correção. Agradeço pela oportunidade oferecida para que eu pudesse cumprir esta importante etapa da minha vida. Agradeço por me ensinar que temos que lutar por aquilo que acreditamos e que temos que ter garra sempre.

À Profa Dra Beatriz Rossetti Ferreira, companheira de laboratório. Agradeço pelo carinho que sempre me tratou. Agradeço pelo o apoio dado de todas as maneiras, material, estrutura, pessoal. Agradeço pela sua força e por ter me ensinado que o trabalho acadêmico pode ser o equilíbrio entre o trabalho árduo e o desfrute dos prazeres da vida.

À Profa. Dra. Mariangela e ao Prof. Luis Fernando Barbisan, por colaborarem com as análises histológicas importantes para o trabalho.

À Profa. Katia Sivieri, pelas análises da microbiota intestinal.

À Luciana, companheira de todo momento, que esteve sempre ao meu lado do começo o fim. Sou imensamente grata pela amizade, pelo apoio, pelos sufocos que contornamos juntas, pelas conversas, pelos experimentos, pela preocupação, pelo carinho e principalmente, agradeço por ter me mostrado um senso muito maior de justiça. Difícil seria sair esta tese sem você.

Ao Luis, companheiro de toda hora. Agradeço por estar sempre ao meu lado em muitos momentos difíceis e em muitos fáceis também. Agradeço desde do chá que preparou, passando pela tese chegando até a percepção que tenho de mim. Agradeço por me mostrar que não é péssimo conviver comigo e principalmente agradeço por ter aprendido muito sobre ter fé. Sem você eu não conseguiria.

À Jessica, que sempre esteve comigo. Agradeço pela sua amizade, pelo seu ótimo humor, pelo companheirismo, pelas idéias revolucionária que sempre trocamos. Agradeço por me mostrar que não se deve desistir e que as coisas podem sair como o previsto.

À Elen, que é sempre preocupada com as coisas. Agradeço pelo probiótico, pelo seu interesse, pelas idéias para o meu projeto, pelo carinho e atenção de sempre. Sou grata por ter me mostrado que as pessoas são mais do que elas aparentam ser. Que elas podem se abrir quando sentirem seguras. Obrigada por se sentir segura.

À Andressa, à Isa, à Jenifer sou grata pelas conversas, pelas risadas, pelo convívio. Agradeço por me mostrarem que é possível muitas pessoas dividirem o mesmo laboratório e ficar tudo bem.

Ao CNPQ, que financiou este estudo.

Por fim, mas não menos importante, sou enormemente grata ao meu pai, a minha mãe, meu irmão, minha cunhada e minhas amigas que sempre me incentivaram. Sem vocês eu talvez não estivesse mais aqui. Agradeço por me apoiarem. Meu mais puro amor e reconhecimento. Sem palavras...

EPÍGRAFE

“Mas como encontrar o equilíbrio? O compositor não sabe tocar todos os instrumentos que usa. Quem toca os instrumentos não necessariamente compõe. Mas para compor uma música (letra, melodia, acompanhamento, arranjos) é necessário que se conheça a essência das partes, suas potencialidades e funções”. “É essa visão holística de ciência que a sociedade moderna perdeu. Hoje temos a formação maciça de técnicos especializados que, com suas visões estreitas e poderes crescentes, comprometem a sobrevivência de nossa espécie. E o culpado não é a ciência, mas a prática científica inadequada”.

Gilson Luiz Volpato em “Ciência: da Filosofia à Publicação”

RESUMO

Silveira, D. S. C. Efeitos imuno-modularores de *Lactobacillus bulgaricus* no câncer colorretal associado à colite. 2017. Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017

O câncer associado à colite (CAC – *colitis-associated cancer*) é um subtipo de câncer colorretal (CRC) precedido por doenças inflamatórias do intestino (IBD – *inflammatory bowel disease*). Diante das altas taxas mundiais de incidência e mortalidade do CRC, muitos esforços têm sido movidos pela comunidade científica em busca do desenvolvimento de novas abordagens e estratégias terapêuticas contra esse tipo de câncer. Doenças inflamatórias do intestino estão associadas a um risco aumentado para o desenvolvimento de CRC e evidenciam assim, a complexa conexão entre inflamação e câncer.

A microbiota intestinal possui papel central na patogênese de IBD. Há evidente aumento no interesse em investigar maneiras de contornar alterações da resposta imunitária do hospedeiro à disbiose microbiana utilizando suplementos à base de microrganismos vivos. Isso ocorre uma vez que estudos com probióticos têm demonstrado o seu grande potencial imunomodulador. A administração de probióticos tem sido associada à manutenção de períodos prolongados de remissão da doença e à ausência de resistência ao tratamento. No presente trabalho, utilizamos modelo experimental de câncer colorretal associado à inflamação para investigar os efeitos do probiótico *Lactobacillus bulgaricus* sobre a carcinogênese. Nossos resultados demonstram papel anti-inflamatório de *L. bulgaricus* na colite induzida por DSS, associado a menores níveis intestinais das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23. Na carcinogênese, o probiótico induziu menores níveis intestinais das citocinas pró-inflamatórias e levou à redução expressiva do volume tumoral total e tamanho médio de tumores ao final do tratamento. Em conjunto, nossos resultados demonstram papel anti-inflamatório e antitumoral de *Lactobacillus bulgaricus* na carcinogênese colorretal associada à inflamação.

Palavras-chave: probiotico, câncer associado à colite, colite, microbiot, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Silveira, D. S. C. Immuno-modulatory effects of *Lactobacillus bulgaricus* on colorectal cancer associated with colitis. 2017. Thesis (Masters) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017

Colitis-associated cancer (CAC) is a subtype of colorectal cancer (CRC) preceded by inflammatory bowel disease (IBD). Faced with the high global rates of CRC incidence and mortality, many efforts have been made by the scientific community to develop new approaches and therapeutic strategies against this type of cancer. IBDs are associated with an increased risk for CRC development, highlighting the complex connection between inflammation and cancer.

The intestinal microbiota has a central role in the pathogenesis of IBD. Currently there is evident increase in interest in investigating manners to circumvent the host's immune response to microbial dysbiosis using a supplement based on live microorganisms. This is because studies on probiotics have demonstrated their high immunomodulatory potential. Probiotic administration has been associated with the maintenance of prolonged remission periods of the disease, and with the lack of resistance to treatment. In the present study, we used experimental model of colorectal cancer associated with inflammation to investigate the effects of the probiotic *Lactobacillus bulgaricus* on carcinogenesis. Our results demonstrate the anti-inflammatory role of *L. bulgaricus* in DSS-induced colitis, which was associated with lower intestinal levels of the cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-23. In carcinogenesis, the probiotic induced lower intestinal levels of the proinflammatory cytokines and led to an expressive reduction of total tumor volume and mean size of tumors at the end of treatment. Taken together, our results demonstrate the anti-inflammatory and antitumor role of *Lactobacillus bulgaricus* in inflammation-associated colorectal carcinogenesis.

Keywords: probiotic, colitis-associated cancer, colitis, microbiota, antitumor activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Barreira intestinal.	22
Figura 2. Modelo experimental indução de colite	49
Figura 3 Modelo experimental indução de câncer colorretal associada à colite.	50
Figura 4. Acompanhamento do peso corporal de animais submetidos ao protocolo de colite induzida por DSS.....	56
Figura 5 Determinação do score clínico da colite experimental induzida por DSS de animais tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	57
Figura 6. Determinação do comprimento do cólon ao final do protocolo de colite induzida por DSS.....	58
Figura 7. Fotomicrografias de cólons de animais submetidos ao protocolo de colite e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	59
Figura 8. Perfil de citocinas intestinais produzidas por animais submetidos à colite e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	60
Figura 9. Quantificação de linfócitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e reguladores presentes no cólon e/ou linfonodos mesentéricos de animais submetidos à colite e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	61
Figura 10. Quantificação de células mielóides presentes no cólon de animais submetidos à colite e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	62
Figura 11. Acompanhamento do peso corporal de animais submetidos ao protocolo de CAC.	64
Figura 12. Determinação do score clínico da inflamação intestinal em animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	65
Figura 13. Perfil da produção intestinal de citocinas animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	67
Figura 14. Perfil da produção citocinas em tumores de animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	68
Figura 15. Efeitos do tratamento com <i>Lactobacillus bulgaricus</i> no desenvolvimento de tumores em modelo murino de CAC	69
Figura 16. Fotomicrografias de secções tumorais de animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sinais clínicos avaliados para determinação do score clínico da inflamação intestinal	49
Tabela 2. Avaliação da composição da microbiota fecal de animais submetidos à colite experimental e tratados com <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância simples
AOM	Axozimetano
AST	Aspartato aminotransferase
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CA	Cripta aberrante
CAC	<i>Colitis-associated cancer</i> (Câncer associado à colite)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Grupamento de diferenciação)
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i> (Domínio de reconhecimento de carboidrato)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Cicloxygenase
CRC	<i>Colorectal cancer</i> (Câncer colorretal)
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i> (Linfócitos T citotóxicos)
CTRL	Controle

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Dendritic cells (Células dendríticas)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Eagle Modificado de Dulbecco)
DSS	Dextran sulfato de sódio
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
EERP	Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i> (Quinase reguladora de sinal extracelular)
FCA	Foco de cripta aberrante
H&E	Hematoxilina & eosina
HCl	Ácido clorídrico
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i> (Doença inflamatória intestinal)
IL	Interleucina
kDa	<i>Kilodalton</i> (Quilodalton)
LNM	Linfonodo mesentérico
MDDC	<i>Monocyte-derived dendritic cell</i> (Célula dendríticas derivadas de monócito)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
ml	Mililitro

MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i> (Metaloproteínase matriz)
MNNG	<i>N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine</i> (N-Metil N-nitro N-nitroguanidina)
NFκB	<i>Nuclear factor-κB</i> (Factor nuclear kappa B)
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i> (Poli (ADP-Ribose) polimerase)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PHAPI	<i>Putative human HLA-DR-associated protein I</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
PUSP-RP	Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SBF	Soro bovino fetal
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
EPM	Erro padrão da média
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophages</i> (Macrófagos associados a tumores)
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween</i>
TF	Thomsen-Friedenreich
TGF	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
Th	<i>T helper</i> (Linfócitos T auxiliares)
TIL	<i>Tumor infiltrating lymphocytes</i> (Linfócitos infiltrantes de tumor)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Barreira intestinal: conceitos gerais e componentes	18
1.2 Microbiota intestinal	22
1.3 Doenças Inflamatórias intestinais	25
1.4 Câncer colorretal associado à inflamação	29
1.5 Proposta terapêutica: PROBIÓTICO.....	38
1.6 Jutificativa.....	43
2. OBJETIVOS.....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 Animais experimentais	48
3.2 <i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	48
3.3 Indução da colite por DSS	48
3.4 Administração de probiótico <i>in vivo</i>	51
3.5 Eutanásia.....	51
3.6 Análise do comprimento do cólon	51
3.7 Avaliação da área, volume, incidência e multiplicidade tumoral	51
3.8 Avaliação microbiológica de amostras fecais.....	52
3.9 Análise histopatológica.....	52
3.10 Dosagem de citocina.....	52
3.11 Isolamento de células colônicas.....	53
3.12 Análise do perfil fenotípico das células imunes infiltrantes do cólon ou presentes nos linfonodos mesentéricos (citometria de fluxo).....	53
3.13 Análise Estatística.....	54
4. RESULTADOS	56
4.1 Efeitos do probiótico <i>Lactobacillus bulgaricus</i> na colite experimental induzida por DSS ...	56
4.2 Efeitos de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> na carcinogênese em modelo <i>in vivo</i> de CAC	63
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Barreira intestinal: conceitos gerais e componentes

O trato gastrointestinal é considerado o órgão imunológico mais sofisticado e complexo de todo o organismo além de ser evolutivamente a região mais antiga do sistema imune inato (MALOY; POWRIE, 2011; SCHULENBURG; KURZ; EWBANK, 2004). Todos os dias milhares de microorganismos e diferentes nutrientes entram em contato com o trato gastrointestinal. As células epiteliais intestinais não só fornecem barreiras físicas impedindo a invasão de potenciais patógenos ou antígenos, mas também são responsáveis em reabsorver nutrientes e água, mantendo assim a homeostase de todo o organismo (MARCHIANDO et al., 2010, 2012, 2013; MARCHIANDO; GRAHAM; TURNER, 2010).

Para cumprir estas múltiplas funções, as células-tronco localizadas na região da cripta diferenciam-se em diversos tipos de células epiteliais. O epitélio intestinal é organizado por uma monocamada celular e consiste em cinco diferentes tipos celulares: enterócitos, células endócrinas, células M, células caliciformes e células de Paneth que se conectam através de sofisticadas junções celulares, como ocludina, claudina-1 e zônula de oclusão 1 (MARCHIANDO; GRAHAM; TURNER, 2010; MOENS; VELDHOFEN, 2012; VIGGIANO et al., 2015). Esta monocamada celular desempenha papel crítico na manutenção da homeostase local pois atua como barreira físico-química que limita o crescimento microbiano e o seu acesso à superfície do intestino (MOENS; VELDHOFEN, 2012; VIGGIANO et al., 2015).

Portanto, cabe ao sistema imunológico do intestino preservar o equilíbrio de sua interação com a microbiota intestinal, prevenir a invasão de agentes patogênicos nocivos, permanecer tolerante a substâncias alimentares inócuas e microorganismos comensais, garantindo absorção de nutrientes. Este equilíbrio imune cuidadosamente regulado, foi moldado por vários milhões de anos de co-evolução entre o hospedeiro e microbiota intestinal e é essencial para o desenvolvimento saudável e para a integridade da barreira intestinal (KURASHIMA; GOTO; KIYONO, 2013; VIGGIANO et al., 2015).

Uma rede complexa de células imunes, conhecida como "tecido linfóide associado ao intestino" (GALT), é composto principalmente por células epiteliais, células dendríticas (DCs), célula natural *killer* (NK), linfócitos (espaços intraepiteliais e lâmina própria - LP), células M, além de tecidos linfóides organizados como: placas de Peyer (PP) e linfonodos

mesentéricos (LNMs). Esse sistema representa cerca de 70% das células imunes do corpo humano inteiro (BEKIARIS; PERSSON; AGACE, 2014).

O epitélio intestinal pode reconhecer produtos microbianos através de sensores como TLR (*Toll-like receptor*) que detectam bactérias, fungos, vírus e protozoários (LARSSON et al., 2012); NLRs (*Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*), responsáveis por reconhecerem produtos bacterianos (ROBERTSON et al., 2013), e por fim os RLRs (*RIG-I-like receptor*), os quais reconhecem componentes virais (BROQUET et al., 2011). Esses componentes do sistema imune contribuem para integridade e regeneração do epitélio sob constante exposição aos antígenos microbianos, mantendo uma barreira mucosa saudável (LAVELLE et al., 2010; UEMATSU; FUJIMOTO, 2010).

As células de Paneth e as caliciformes são responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos e mucinas, respectivamente, e ainda auxiliam na transcitose de IgA pelo epitélio colunar (KURASHIMA; GOTO; KIYONO, 2013). O muco produzido pelas células caliciformes bloqueia adesão direta de bactérias comensais ao epitélio (BIRCHENOUGH et al., 2015). Somado a produção de moléculas antimicrobianas, as células caliciformes também contribuem para homeostase intestinal ao entregarem antígenos de baixo peso molecular às DCs-CD103+ tolerogênicas, as quais são capazes de induzir células T reg (BEKIARIS; PERSSON; AGACE, 2014).

As células M estão associadas às PP e carregam antígenos à DCs encontradas nas regiões interfoliculares e na região subepitelial, auxiliando na rápida apresentação de antígenos às células T e B (MABBOTT et al., 2013).

As DCs do intestino estão presentes no espaço intraepitelial, na lâmina própria e nos tecidos intestinais linfóides organizados. DCs intraepiteliais CX3CR1- penetram a camada celular do epitélio sem causar danos a essa barreira e capturam antígenos do lúmen (BEKIARIS; PERSSON; AGACE, 2014). Além de apresentar antígenos patogênicos para os linfócitos também participam da manutenção do equilíbrio da resposta imune intestinal. DCs mielóides encontradas na cúpula subepitelial das PP produzem IL-10 após ativação por CD40L e podem apresentar antígenos às células T CD4+ estimulando-as a produzirem IL-4 e IL-10 (MANN; LI, 2014).

Os linfonodos mesentéricos (LNMs) compreendem os maiores gânglios linfóides do organismo. Através dos vasos linfáticos eferentes, antígenos capturados por DCs nas PP e lâmina própria são levados aos linfonodos mesentéricos e lá são apresentados às células T.

Esses linfócitos T expressam em sua superfície moléculas de adesão L-selectina e $\alpha 4\beta 7$ -integrina que auxiliam em seu acúmulo nos LNMs as quais normalmente direcionam os linfócitos para a periferia e para as mucosas, respectivamente (WAGNER et al., 1998).

As PP são compostas por folículos ricos em células B circundados por uma malha de células T chamada de regiões interfoliculares. As células B representam 75% das células encontradas nas PP e podem formar centros germinativos mesmo em condições de homeostasia, devido à constante estimulação com antígenos das bactérias comensais. Nesses centros germinativos há um ambiente propício para ocorrer o *switching* de classe de IgM para IgA nas células B (KUNISAWA et al., 2015; KUNISAWA; KURASHIMA; KIYONO, 2012).

Na lâmina própria, localizada na camada inferior das células epiteliais intestinais, encontram-se neutrófilos, macrófagos, DCs, linfócitos, mastócitos e as recentemente descobertas células linfoides inatas (ILCs), que participam da resposta inata e adquirida e na manutenção da homeostase entre microbiota e intestino (SHI et al., 2017).

Tanto as células T $CD4^{+}$ quanto as células T $CD8^{+}$ são encontradas na lâmina própria com uma proporção aproximada de 2:1. O perfil de células T $CD4^{+}$ da lâmina própria é altamente diversificado, contendo subconjuntos de $IL-2^{+}$, $IL-2^{+} IFN\gamma^{+}$, $IFN\gamma^{+}$ e $IL-17^{+}$ bem como $IL-10^{+} Foxp3^{+}$ (IVANOV et al., 2006; MAYNARD et al., 2007; SATHALIYAWALA et al., 2013; VEENBERGEN; SAMSOM, 2012). No entanto, a distribuição e a função desses subconjuntos diferem marcadamente ao longo do comprimento do intestino devido, pelo menos em parte, às variações no conteúdo luminal (DENNING et al., 2011).

Uma correlação inversa entre o número de células Th17 e células T reguladores (Treg) foi encontrada ao longo do comprimento do intestino em camundongos não doentes, com números de células Th17 diminuindo progressivamente do duodeno para o cólon e os números de células Treg sendo mais altos no cólon (DENNING et al., 2011). Embora as células T $CD4^{+}$ produtoras de IL-10 estejam presentes em grandes quantidades ao longo da mucosa intestinal, elas parecem ser mais dominantes no cólon (MAYNARD et al., 2007).

As células T respondem rapidamente ao sinal do lúmen e iniciam respostas inflamatórias e anti-inflamatórias. O microbioma intestinal promove a diferenciação de células T $CD4^{+}$ e ativação de células T $CD8^{+}$ naivas (LUI et al., 2015). As células T $CD4^{+}$ da lâmina própria secretaram IL-17 e IL-22, que estão envolvidas na regulação da inflamação

intestinal (MUÑOZ et al., 2009). Além disso, células epiteliais intestinais também produzem IL-17, o que pode induzir a expressão de quimiocinas (AWANE et al., 1999).

Os macrófagos são os leucócitos mais abundantes na lâmina própria intestinal saudável. Eles têm várias funções importantes na homeostase intestinal, incluindo a fagocitose e degradação de microorganismos e células de tecido morto, bem como a produção de mediadores que conduzem a renovação celular. Eles também produzem grandes quantidades de IL-10, que não apenas previne a inflamação ao bloquear as respostas pró-inflamatórias aos estímulos, como a ligação de TLR (MELILLO et al., 2010; TAKEDA et al., 1999; UEDA et al., 2010), mas também, promove a sobrevivência e as funções das células locais Treg FOXP3⁺ na mucosa (HADIS et al., 2011; MURAI et al., 2009). A produção de IL-1 β por macrófagos residentes em resposta à microbiota mantém a atividade celular TH17 no intestino (SHAW et al., 2012). A capacidade dos macrófagos intestinais para responder à IL-10 também é um fator crucial na manutenção da homeostase local, uma vez que o seu *knockout* leva a colite espontânea em camundongos (SHOUVAL et al., 2014; ZIGMOND et al., 2014). Estas propriedades são bastante específicas para o intestino e, ao contrário de muitos outros macrófagos de tecidos, os da mucosa intestinal são derivados da reposição contínua de monócitos do sangue que diferenciam localmente sob o controle do ambiente da mucosa (BAIN et al., 2014).

Os primeiros estudos que fenotiparam os macrófagos intestinais em camundongos e humanos usaram os marcadores específicos, como F4/80 (EMR4), CD68 (macrosialina) e CD163. Eles mostraram que os macrófagos estão presentes tanto no cólon quanto no intestino delgado, onde representam o maior grupo de fagócitos mononucleares no corpo (WEBER; SAURER; MUELLER, 2009). Estudo mais recente concorda que os números absolutos e as frequências relativas dos macrófagos são maiores no cólon do que no intestino delgado (DENNING et al., 2011).

Quatro subconjuntos de células dendríticas foram identificados nas preparações de células de lâmina própria de intestino de camundongos e são classificados com base em sua expressão de CD103 (também conhecida como integrina α E) e CD11b. Células dendríticas CD103⁺ CD11b⁻ e CD103⁺ CD11b⁺ são as mais abundantes e diferem em fatores de transcrição (DENNING et al., 2011; WEBER; SAURER; MUELLER, 2009).

Figura 1: Barreira intestinal. Células epiteliais (enterócitos, células de Paneth e células caliciformes) formam uma barreira física contra a invasão bacteriana e secretam proteínas antimicrobianas que atingem a parede bacteriana, auxiliando na eliminação das bactérias que penetraram sobre o muco intestinal. Plasmócitos diferenciadas a partir de linfócitos B secretam moléculas de S-IgA que são transportadas via transcitose pela camada epitelial e secretadas pela superfície apical das células epiteliais limitando o número de bactérias associadas à mucosa e prevenindo sua penetração. Linfócitos intraepiteliais se localizam na parte basolateral das junções epiteliais e respondem à dano epitelial secretando fatores de crescimento, promovendo reparo tecidual e produzindo fatores pró-inflamatórios e antimicrobianos. Macrófagos e células dendríticas da lâmina própria processam e apresentam os antígenos internalizadas via célula M ou captados diretamente por células dendríticas para células TCD4⁺ virgens que se diferenciam em células T efetoras e T regulatórias. Adaptado de (MOWAT, 2003).

1.2 Microbiota intestinal

A microbiota intestinal é o conjunto de microrganismos comensais que colonizam o lúmen intestinal e pode chegar a 10^{14} bactérias, as quais perfazem aproximadamente 1000 espécies diferentes. Isso significa que o número de bactérias no intestino é 10 vezes superior ao número total de células do corpo humano (KAMADA et al., 2013). O estabelecimento da microbiota madura é um processo dinâmico que ocorre nos primeiros 2 anos de vida e coincide com o desenvolvimento do sistema imunológico (JAIN; WALKER, 2014), o que

sustenta a teoria de que a formação da microbiota intestinal não é um evento aleatório, mas sim, um processo evolutivo estabelecido que fornece um nicho rico e especializado para membros selecionados de apenas alguns filos bacterianos (LEI; NAIR; ALEGRE, 2015).

Mais de 99% da microbiota intestinal é composta por espécies que fazem parte de quatro filos bacterianos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Espécies gram-positivas e aeróbias são facilmente encontradas no intestino delgado proximal enquanto as espécies gram-negativas são predominantes na porção distal. Distalmente à válvula ileocecal, a concentração de bactérias aumenta drasticamente, sendo o cólon a região do trato gastrointestinal mais densamente povoada por bactérias, principalmente *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Fusobacteria*, *Clostridia* e *Peptostreptococci* (ECKBURG, 2005; JÄGER; STANGE; WEHKAMP, 2013).

Devido à diversidade da microbiota intestinal, é empiricamente difícil definir a composição da microbiota intestinal saudável ou relacionada com doença, mas evidências crescentes sugerem que as alterações na composição da microbiota intestinal podem contribuir para o ambiente intestinal saudável ou patológico (JANDHYALA et al., 2015). Observou-se que em um mesmo indivíduo, a proporção de *Firmicutes* pode apresentar variações significativas, enquanto que as de *Bacteroidetes* parece ser estável. Fatores genéticos também têm um papel importante no desenvolvimento da microbiota intestinal, apesar do ambiente condicionar a aquisição de diferentes espécies (BIEN; PALAGANI; BOZKO, 2013; PALMER et al., 2007).

A microbiota intestinal mantém uma relação simbiótica com a mucosa intestinal e desempenha funções importantes como metabolismo de nutrientes, metabolismo de drogas e xenobióticos, proteção antimicrobiana, manutenção da integridade da barreira intestinal e imunomodulação (JANDHYALA et al., 2015)

O sistema imune inato reconhece componentes ou produtos microbianos através de diferentes padrões de receptores de reconhecimento (PRRs) encontrados em vários tipos celulares incluindo macrófagos, DCs e células epiteliais (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015). Um dos imunomoduladores bacterianos mais caracterizados reconhecido por TLR2 é o polissacarídeo A (PSA) da *Bacteroides fragilis* que tem capacidade de modular células T para o desenvolvimento da homeostase (TROY; KASPER, 2010). Estudos recentes revelam que PSA ativa TLR2 em DC plasmocitóides em vez de DC convencionais, levando à indução da secreção de IL-10 por células T CD4⁺, culminando em proteção da mucosa (DASGUPTA et

al., 2014). Componente do envelope bacteriano de *Lactobacillus plantarum* também sinaliza através de TLR2 promovendo resposta pró-inflamatória em DCs que modula populações de células T reguladoras e efectoras (SMELT et al., 2013). Flagelina bacteriana é reconhecida por TLR5 expresso em células epiteliais intestinais (IECs) e DCs. A sinalização TLR5 derivada de IEC parece influenciar a composição da microbiota e a resposta do hospedeiro (CHASSAING; LEY; GEWIRTZ, 2015). Linfócitos intraepiteliais (IELs) responsáveis pela homeostase da microbiota são regulados positivamente através da citocina IL-15, produto da via de NOD2 que reconhece peptídeoglicanas (ECKBURG, 2005). NOD2 nas células caliciformes estão envolvidos na restrição do crescimento de *Bacteroides vulgatus* no intestino delgado prevenindo a inflamação intestinal em camundongos (RAMANAN et al., 2014).

Todavia, a homeostase intestinal pode ser facilmente posta em risco por distúrbios da microbiota normal resultando em efeitos negativos para o hospedeiro. A disbiose, alteração da população da microbiota comensal, pode levar à inflamação e lesão do tecido da mucosa, que parece predispor para situações como, doenças inflamatórias do intestino, câncer colorretal e síndrome do intestino irritável. A disbiose pode ser gerada pelo uso de antibióticos, estresse, dieta ocidental e higiene (BIEN; PALAGANI; BOZKO, 2013; ECKBURG, 2005; JIANG et al., 2013; PALMER et al., 2007)

Estudos têm sugerido que a microbiota fecal e da mucosa intestinal de doentes com doenças inflamatórias do intestino são diferentes das encontradas em participantes controle, sendo que há diferença entre a fase passiva e ativa da doença. Além disso, em condições patológicas observou-se uma diminuição da concentração de *Firmicutes* e aumento de *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* (CONTE et al., 2006; SOKOL et al., 2006; TAKAISHI et al., 2008; WALKER et al., 2011).

Tal como mencionado anteriormente, no que concerne aos fatores genéticos que condicionam a etiologia das DII, mutações no gene NOD2/CARD15 condicionam alterações na ativação de NF- κ B e diminuição da capacidade de autofagia das células dendríticas, essencial para a eliminação de patógenos (KNIGHTS; LASSEN; XAVIER, 2013; LODDO; ROMANO, 2015; SCHARL; ROGLER, 2012). Nas DII, ocorre perda de tolerância às bactérias comensais, conduzindo a um processo de inflamação crônica em que a microbiota estimula constantemente o sistema imune do hospedeiro, perpetuando a doença (QUIGLEY, 2013; SARTOR, 2008; STROBER; FUSS; MANNON, 2007).

1.3 Doenças Inflamatórias Intestinais

A evolução das doenças inflamatórias intestinais (DIIs) segue com o avanço da sociedade (KAPLAN, 2015). A documentação sistemática da colite ulcerativa começou na Europa Ocidental nos anos 1800, com o primeiro relato de caso publicado por Sir Walter Wilks em 1859 (WILKS; MOXON, 1875). O surgimento da colite ulcerativa na Europa Ocidental acompanhou o advento da revolução industrial nos anos 1800 (MULDER; NOBLE; JUSTINICH; DUFFIN JM., 2014).

A revolução industrial deu origem a uma urbanização aumentada, com uma mudança nas economias de áreas rurais e agrícolas para as áreas urbanas. A crescente densidade populacional dentro das cidades mudou muito a dieta e os estilos de vida - hoje essas mudanças sociais são chamadas de ocidentalização, remetendo aos países Europa Ocidental, Estados Unidos, Canadá, Austrália e Nova Zelândia (CRAFTS, 2004), que tiveram suas histórias industrial concomitantes com a revolução industrial (BURISCH; JESS; MARTINATO; LAKATOS, 2013).

A década de 1950 foi considerada o marco da aceleração da civilização humana, caracterizada pelo crescimento global exponencial da população humana (WATERS; et al, 2016). O rápido aumento da população foi impulsionado pelo avanço econômico, pela automação, pelo aumento da produção de alimentos e pela utilização profunda de recursos e energia (WATERS; et al, 2016). Do mesmo modo, a incidência de colite ulcerativa e doença de Crohn explodiu em países ricos e ocidentalizados nos últimos 50 anos do século XX (MOLODECKY, 2011).

O final do século 20 é reconhecido como o início da globalização, pelo qual alguns países industrializados da Ásia, Oriente Médio e América do Sul tornaram-se mais ocidentalizado. Durante esse período, os países recém-industrializados experimentaram rápido crescimento da população, urbanização, industrialização e ocidentalização da cultura (ZWI; MILLS, 1995).

Atualmente, no Brasil, estudos para relatar a prevalência e incidência da DIIs não refletem o perfil epidemiológico real da doença no país, sendo essas consideradas baixas. Estes estudos apresentam dificuldades em gerar dados exatos devido à heterogeneidade e tamanho do território brasileiro (VICTORIA; SASSAK; et al, 2009, PARENTE; COY; et al, 2015).

As duas principais doenças inflamatórias intestinais são a doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC). A grande diferença entre elas é que a doença de Crohn pode afetar toda a parede intestinal e qualquer parte do trato gastrointestinal, mais comumente o íleo terminal ou a região perianal de forma não contínua, além de ser comumente associada a complicações como abscessos, fístulas e restrições. Em contraste, a colite ulcerativa se caracteriza por inflamação e ulceração da camada mais superficial da mucosa do cólon e a inflamação é máxima no reto (OTT; SCHOLMERICH, 2013).

De forma geral, os pacientes com DIIs apresentam sinais e sintomas como diarreia persistente, sangramento retal, dor abdominal, obstrução intestinal, fístulas, febre, fadiga e perda de peso (HENDRICKSON; GOKHALE et al, 2002; FUSS, HELLER et al 2004, MARTINS; PEPPERCORN, 2004; VAN ASSCHE; DIGNASS et al, 2010; KALLA; VENTHAM et al, 2014). A inflamação exacerbada leva a danos prolongados e muitas vezes irreversíveis da função e estrutura gastrintestinal (BOUMA; STROBER, 2003).

1.3.1 Patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais

Embora a etiologia das DIIs permaneça em grande parte desconhecida, pesquisas têm indicado que a susceptibilidade genética do indivíduo, o ambiente externo, a microbiota intestinal e a resposta imune estão todos envolvidos e funcionalmente integrados na patogênese das DIIs (XAVIER; PODOLSKY; 2007; ABRAHAM; CHO; 2009; DANESE; FIOCCHI; 2006).

Estudos recentes descobriram que 163 genes estão associados as DIIs, dos quais 110 estão associados a ambas as doenças (CD e UC), sendo que 30 genes estão relacionados especificamente com a doença de Crohn e 23 genes estão associados a colite ulcerativa (JOSTINS; et al., 2012). A maioria destes genes estão envolvidos na resposta imune, autofagia, estresse do retículo endoplasmático, função barreira epitelial intestinal e vias de defesa microbiana (JOSTINS; et al., 2012; KHOR; GARDET; XAVIER; 2012; LIU; et al., 2015; RIOUX; et al., 2007; HAMPE; et al., 2007; MCCARROLL; et al., 2008; ANDERSON; 2011; BRAND; 2009; TRAVASSOS; 2010; KUBALLA; 2008). Estudos genéticos melhoraram a compreensão da patogênese das DIIs, no entanto, não está claro qual é a razão da maioria das pessoas que possuem variáveis de risco associadas às DIIs permanecem saudáveis (VENTHAM; et al., 2013).

Não há dúvidas de que os fatores ambientais desempenham um papel importante na patogênese das DIIs. Um grande número de fatores ambientais é considerado fator de risco para as DIIs, incluindo tabagismo, dieta, drogas, geografia, estresse social e psicológico (VENTHAM; et al., 2013).

Os nutrientes e metabolitos da alimentação em combinação com fatores genéticos, afetam a microbiota intestinal e impactando o risco de inflamação (KAPLAN; NG, 2017). A transição de populações de regiões rurais para cidades urbanas é muitas vezes acompanhada por maior abundância de alimentos, inatividade física e estresse psicossocial (LOFTUS; 2004). Vários estudos têm associado o consumo regular de *fast food* com risco de doença de Crohn e colite ulcerativa. Isso pode estar diretamente relacionado a altos níveis de ácidos graxos mono e poli-insaturados e açúcar ou indiretamente relacionado ao estilo de vida menos ativo de pessoas que consomem este tipo de alimentação (SUEZ; et al., 2014; CHASSAING; et al., 2015; BURISCH; 2014; SAKAMATO; et al., 2015).

O estresse tem sido apontado em favorecer a patogênese de doença de Crohn e colite ulcerativa (MAUNDER; 2005; MAWDSLEY; RAMPTON; 2005; MAWDSLEY; RAMPTON; 2006). Estudo sugeriu que os indivíduos com níveis mais baixos de estresse tinham um risco reduzido em iniciar a doença. Além disso, depressão e ansiedade podem desempenhar um papel importante na piora das DIIs (CÁMARA; 2011; GOODHAND; et al., 2012).

Em condições não patogênicas, o sistema imune do hospedeiro é tolerante aos antígenos da microbiota comensal do intestino. A desregulação das respostas imunes direcionadas à bactéria comensal é conhecida por estar envolvida no início do desenvolvimento de DII (MIKOV; STOJANČEVIĆ; BOJIC, 2014). Evidências científicas sugerem que as DIIs seriam o resultado de dois mecanismos iniciais: da excessiva função de células T efetoras ou da função deficiente das células Treg. O desenvolvimento da DII experimental utilizando-se modelos animais geneticamente deficientes para elementos reguladores da mucosa intestinal como a IL-10, confirmaram essa hipótese (GOMES-SANTOS, 2012).

Células T ativadas produtoras de IFN- γ e de TNF- α agem sinergicamente modificando a morfologia das células endoteliais dos vasos sanguíneos próximos ao sítio inflamatório, permitindo um aumento do fluxo sanguíneo, da permeabilidade vascular, da expressão de moléculas de adesão (ICAMs) e da migração de leucócitos e proteínas para o

foco inflamatório (SCHREIBER, 1998; MARINI, 2003). Fatores genéticos são importantes moduladores da severidade da doença, porém bactérias comensais entéricas também são requeridas para iniciar e manter a inflamação intestinal ou colônica, a qual é mediada principalmente por linfócitos T (OSTANIN et al., 2009, LIU, VAN SOMMEREN et al. 2015).

A ativação desregulada do sistema imune intestinal desempenha um importante papel na patogênese dessas doenças, visto que pacientes com doença inflamatória intestinal apresentam extensivo infiltrado inflamatório, edema, perda de células caliciformes, diminuição na produção de muco, hiperplasia de células crípticas e ulceração, observados em cortes histológicos (OSTANIN et al., 2009).

Embora doença de Crohn e colite ulcerativa sejam clinicamente semelhantes, é possível observar padrões de resposta imune bastante distintos. Em geral, os pacientes com DC apresentam resposta de células T helper 1 (Th1), com produção de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , e, recentemente, descobriu-se a presença de resposta Th17, com produção das citocinas IL-17 e IL-23 na mucosa inflamada. Já os pacientes portadores da colite ulcerativa apresentam inflamação intestinal caracterizada pela presença de resposta imune Th2, com presença de IL-4, IL5 e IL-13 (FUJINO, ANDOH et al, 2003; IWAKURA, ISHIGAME, 2006; IBOSHI, NAKAMURA et al 2014).

Na doença de Crohn observa-se resposta imunológica adaptativa mediada principalmente por células Th1 secretoras de IFN- γ , com ativação dos fatores de transcrição T-bet e STAT-4. Linfócitos secretadores de IFN- γ são abundantes na lâmina própria da mucosa intestinal de pacientes com esta doença. Neste mesmo local ocorre aumento nos níveis de IL-18, citocina envolvida na perpetuação da resposta imunológica do tipo Th1 (MONTELEONE et al., 1999; PIZARRO et al., 1999). Foi observado que células Th17 estão envolvidas no desenvolvimento desta doença juntamente com as células Th1 (MAYANARD; WEAVER, 2009). Dambacher et al. (2009) demonstraram número aumentado de células T expressando o fator de transcrição ROR γ t, característico de células Th17, na lâmina própria de pacientes com esta doença. Apesar de células Th1 regularem negativamente a diferenciação de células Th17, alguns trabalhos mostraram a presença de um conjunto de células Th17 capazes também de secretar citocinas do perfil Th1, como o IFN- γ , nos sítios inflamatórios, além das próprias Th1 (ANNUZIATO et al., 2007; ACOSTARODRIGUEZ et al., 2007).

1.3.2 Modelo experimental de colite

Grande variedade de modelos experimentais é utilizada para o estudo da DII em camundongos, sendo que fatores genéticos podem diferenciar a gravidade da doença apresentada pelo modelo (BOUMA 2004). Camundongos C57BL/6 são bons modelos de DII induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), desenvolvendo características patológicas semelhantes à doença em humanos (YAN, KOLACHALA et al., 2009). Sabe-se que o DSS se associa a ácidos graxos, tais como dodecanoato do lúmen intestinal para indução da colite (LAROUÏ, INGERSOLL et al., 2012) e que sua atividade inflamatória é conferida principalmente pelo dextran. Esta ideia é apoiada pelo fato de que quando o dextran entra no citoplasma, citocinas são sintetizadas, sinalizando para aumentar a inflamação intestinal e, assim, os efeitos deletérios do DSS são direcionados principalmente para o cólon distal (LAROUÏ; INGERSOLL et al., 2012). Porém, os mecanismos exatos que correlacionam a inflamação intestinal experimentalmente induzida por DSS, à desregulação do sistema imunológico e inflamação exacerbada que ocorre na DII humana ainda não são totalmente conhecidos.

Diferentes trabalhos mostram que durante a fase de indução da DII usando DSS, os animais apresentam índice grave da doença, com infiltração massiva de leucócitos polimorfonucleares no cólon (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos) e níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias principalmente do perfil Th1 e Th17 (TNF- α , IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-1 β e IL-17) (YAN, KOLACHALA et al., 2009). Já nos períodos de recuperação, há aumento acentuado dos mediadores anti-inflamatórios IL-10, IL-4 e TGF- β , que são essenciais para a resolução de intestinal inflamação (PELLISSIER, MULLER et al. 2006, BENTO, LEITE et al., 2012, KIM, SHAJIB et al., 2012, MIELKE, JONES et al., 2013). Estes achados mostram que o padrão de resposta imunológica na inflamação intestinal induzida por DSS é muito semelhante com o que ocorre no humano, quando há o desenvolvimento principalmente da doença de Crohn (MONTELEONE, BIANCONE et al., 1997; PARRONCHI, ROMAGNANI et al., 1997; FUJINO, ANDOH et al., 2003; YAN, KOLACHALA et al., 2009).

1.4 Câncer colorretal associado à inflamação

Configurando-se como uma das principais causas de mortalidade em países de diferentes níveis de renda (FERLAY et al., 2015; TORRE et al., 2016), o câncer cursa com

elevado ônus psicossocial e econômico e permanece como um relevante problema de saúde pública com impacto global (TORRE et al., 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Por conseguinte, o número de casos de câncer e mortes por esta doença, deverão aumentar rapidamente à medida que as populações crescem, envelhecem e adotam comportamentos de estilo de vida que aumentam o risco para o desenvolvimento do câncer (TORRE et al., 2015; TORRE et al., 2016).

Particularmente, o câncer colorretal (CCR) é um dos tumores mais incidentes em âmbito mundial (TORRE et al., 2015; SIEGEL et al., 2017), sendo o terceiro tipo de câncer mais comumente diagnosticado entre homens e o segundo em mulheres, com uma taxa de incidência global de 1,4 milhão de casos (TORRE et al., 2015). No Brasil, dados da última estimativa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), apontam para o biênio 2016-2017, uma ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer, dentre os quais 16.660 casos novos de CCR em homens e de 17.620 em mulheres (INCA, 2015).

No que diz respeito às taxas de mortalidade para o CCR, mundialmente, foi estimado 694 mil casos em ambos os sexos (8,5% do total de óbitos) (TORRE et al., 2012; TORRE et al., 2015). Em contraste com as tendências de incidência, tem sido observado uma diminuição das taxas de mortalidade por CCR em diversos países da Europa Ocidental e dos Estados Unidos da América, provavelmente devido a melhorias no rastreamento deste tipo de tumor, além da diminuição da prevalência de fatores de risco, e avanços na terapêutica e tratamentos (EDWARDS et al., 2010; BOSETTI et al., 2011). Contudo, as taxas de mortalidade têm aumentado consideravelmente em países com recursos limitados, incluindo o Brasil, o Chile, a Romênia e a Rússia (BOSETTI et al., 2013; Chatenoud et al., 2014).

As taxas de sobrevivência do CCR são apresentadas para homens e mulheres combinados porque eles não variam substancialmente pelo sexo (SIEGEL et al., 2017). Destarte, as taxas de sobrevivência relativa de 5 anos e 10 anos para pessoas com CCR são 65% e 58%, respectivamente. Quando o CCR é detectado em um estágio localizado, a taxa de sobrevivência relativa de 5 anos é de 90% (MILLER et al., 2016). Embora a história natural do CCR seja um processo lento que propicia condições ideais para prevenção e detecção precoce, ressalta-se que a sobrevida de pacientes com CCR é altamente dependente do estágio da doença (SIEGEL et al., 2017). Quanto mais precoce o diagnóstico da doença, melhor o prognóstico e maior a sobrevida do paciente (MILLER et al., 2016; SIEGEL et al., 2017).

Ressalta-se que o CCR é a doença resultante do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas que acabam por transformar a mucosa normal do intestino grosso e/ou reto em adenocarcinoma (YAMAGISHI et al., 2016). Dentre os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento dessa neoplasia destacam-se história familiar positiva de câncer (alterações genéticas hereditárias), estilo de vida e predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino (INCA, 2015). A depender desse contexto, esse tipo de câncer pode ser tradicionalmente dividido em CCR esporádico, hereditário e ou associado à inflamação, respectivamente. Recentemente, estudos têm sugerido que mesmo a microbiota intestinal e/ou seus metabólitos também têm um papel importante na etiologia do CCR (LOUIS; HOLD; FLINT, 2014; WANG et al., 2017; KANG et al., 2017).

Apesar de a maioria das neoplasias resultarem de interações complexas entre o genoma do indivíduo e o ambiente, um percentual de casos decorre particularmente de alterações herdadas que conferem uma maior predisposição ao desenvolvimento de tumores. Cerca de 5 a 10% de todos os cânceres estão associados à predisposição hereditária (RICH et al., 2014). A predisposição hereditária a cânceres exibe um padrão de herança autossômica dominante e ocorre em indivíduos com mutações germinativas que frequentemente apresentam alta penetrância, tornando-os mais suscetíveis a desenvolver certas Síndromes Neoplásicas Hereditárias (SNH) (CUEVAS-CUERDA; SALAS-TREJO, 2014). As SNH são desordens genéticas nas quais neoplasias malignas se aglomeram em certas famílias. As duas principais SNH relacionadas a CCR são a polipose adenomatosa familiar (PAF) e HNPCC ou Síndrome de Lynch e correspondem a cerca de 15% de todos os casos de CCR (TAYLOR et al., 2010).

Todavia, a grande maioria, representada por mais de 70% dos casos de CCR são esporádicos, ou seja, ocorrem a partir de mutações somáticas e evolução do clone celular tumoral (RUSTGI, 2007; MUNDADE et al., 2014). Estes casos estão geralmente relacionados ao estilo de vida, dieta e exposição ocupacional do indivíduo (HIGGINSON, 1993; LICHTENSTEIN et al., 2000; PLOTTEL; BLASER, 2011; CHAN et al., 2011; KRUK; CZERNIAK et al., 2013).

Além disso, cursando com menor frequência, o câncer associado à colite (CAC) corresponde a 2-3% dos casos de CCR, os quais são precedidos por doenças inflamatórias intestinais, tais como a Doença de Crohn e a colite ulcerativa (GRIVENNIKOV, 2013; SUBRAMANIAM; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2016). Quando comparados à população

em geral, pacientes com DIIs apresentam risco aumentado de desenvolver esse tipo de câncer possivelmente devido à proliferação crônica necessária para o reparo dos danos epiteliais causados pela constante inflamação (ROMANO et al., 2016). Em adição, CAC apresenta um maior potencial maligno em comparação ao CCR esporádico (WATANABE et al., 2016).

O desenvolvimento de CAC difere do CCR esporádico no que tange à sequência de eventos moleculares que levam à carcinogênese e à morfologia das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas. O câncer de cólon associado à inflamação é caracterizado por lesões displásicas e exibe uma sequência inflamação-displasia-adenocarcinoma (WESTBROOK; SZAKMARY; SCHIESTL, 2010), enquanto que o CCR esporádico apresenta uma transição de criptas normais a adenoma e finalmente adenocarcinoma (TERZIC et al., 2010; BEAUGERIE; ITZKOWITZ, 2015; WEST et al., 2015; SUBRAMANIAM; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2016). Quando comparada ao pólipó (ou adenoma) formado na carcinogênese de CCR esporádico, a displasia que antecede o desenvolvimento de CAC caracteriza-se por lesões planas e com bordas dificilmente identificáveis por técnicas endoscópicas padrão (BEAUGERIE; ITZKOWITZ, 2015). Em conjunto, essas diferenças são decorrentes, principalmente, da diferença causal e cronológica das alterações moleculares que levam à tumorigênese (BEAUGERIE; ITZKOWITZ, 2015).

Em CAC, o estresse oxidativo, a inflamação crônica e a inativação de mecanismos de reparo decorrentes da colite levam a mutações ou perda de heterozigosidade em p53 e ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2), iniciando assim a displasia das células epiteliais. Contrariamente, mutações em p53 só ocorrem tardiamente em CCR esporádico (TERZIC et al., 2010; BEAUGERIE; ITZKOWITZ, 2015; WEST et al., 2015; SUBRAMANIAM; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2016). Ademais, mutações que levam à perda da função do gene supressor de tumor polipose colônica (APC) são eventos iniciais da tumorigênese em CCR esporádico e tardios em CAC, por exemplo (TERZIC et al., 2010; BEAUGERIE; ITZKOWITZ, 2015; WEST et al., 2015; SUBRAMANIAM; MIZOGUCHI; MIZOGUCHI, 2016).

O gene supressor de tumor p53 é responsável pela indução de morte celular programada (apoptose) e senescência em resposta a danos celulares gerados por estresse, possibilitando assim a eliminação de células alteradas com potencial capacidade de transformação maligna (LI et al., 2015). O gene APC, por sua vez, controla a atividade do oncogene β -catenina. Normalmente, APC forma um complexo proteico que induz a

ubiquitinação e subsequente degradação proteossômica de β -catenina. A perda de função de APC resulta em proliferação celular decorrente do acúmulo de β -catenina. Nestas condições, a proteína β -catenina transloca para o núcleo e leva à transcrição de genes envolvidos com a proliferação celular, dentre eles ciclina-D1 e c-myc (NOUBISSI et al., 2006; KWONG; DOVE, 2009). Embora mutações no gene APC não sejam comuns em estágios iniciais da carcinogênese de CAC, diferentes vias inflamatórias podem induzir um aumento da sinalização Wnt/ β -catenina, tais como NF- κ B, PI-3K e Akt (KALER et al., 2009; WRIGHT et al., 2010; LEE et al., 2010). Em adição, formas mutantes do oncogene KRAS são evidentes em cerca de 30-40% dos cânceres colorretais e em CAC leva à transição de displasia de baixo grau para uma de alto grau pela estimulação de importantes processos celulares, tais como proliferação, transformação e diferenciação (HUTCHINS et al, 2011; IMAMURA et al, 2012; INOUE et al, 2012; BEAUGERIE; ITZKOWITZ, 2015).

1.4.1 Patogênese do câncer associado à colite

Evidências provenientes de estudos em modelos murinos de câncer colorretal associado à colite, bem como a partir de estudos conduzidos com pacientes com câncer associado a DII, têm mostrado que células do sistema imune tais como neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células mielóides supressoras e células T presentes no microambiente tumoral favorecem a proliferação, expansão e sobrevivência de células tumorais via produção de mediadores solúveis, incluindo citocinas, por meio da ativação de fatores de transcrições, como o STAT-3 e NF- κ B (GRIVENNIKOV et al., 2009; GARRETT et al, 2009; NEUFERT et al., 2013; FRANCESCONI; HOU; GRIVENNIKOV, 2015).

Durante o curso da inflamação intestinal, infiltrados de células do sistema imune inato, principalmente neutrófilos e macrófagos, produzem quantidades aumentadas de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), o que resulta em um aumento no estresse oxidativo intestinal (MEIRA et al., 2008; WESTBROOK et al., 2009). Estes radicais são capazes de interagir com o DNA de células residentes e induzir algumas alterações como por exemplo, quebras de cadeia única e dupla, modificações de nucleotídeos e mutações genéticas. Tais alterações podem atuar como gatilho para a iniciação tumoral por interferir no funcionamento de oncogenes ou genes supressores de tumor (BRENTNALL et al., 1994; MATKOWSKYJ et al., 2013). Um corpo de evidências suportam de modo consistente o papel crucial do estresse

oxidativo dependente da inflamação na indução de mutações que levam ao CAC (FRANCESONE; HOU; GRIVENNIKOV, 2015).

Salienta-se que a característica primordial das células imunes ativadas é a produção e secreção de fatores de crescimento e citocinas que modulam o microambiente inflamatório nos tecidos tumorais. Por conseguinte, alterações sistêmicas e locais do perfil de citocinas têm sido demonstradas no CAC por diversos trabalhos (AREND et al., 2008; KANTOLA et al., 2012; DE SIMONE et al., 2013). Em adição, evidências sugerem que várias citocinas pro-tumorigênicas e também anti-tumorigênicas são expressas de forma diferente em tecidos distintos em CAC e seu efeito sobre as células imunes está intimamente relacionado à progressão tumoral (FANG et al., 2013)

No contexto da DII, células dendríticas da lâmina própria (DC) e macrófagos da mucosa intestinal, após serem ativados em resposta à presença de microbiota comensal ou de sinalização TLR (FUKATA et al., 2007; FUKATA et al., 2009) secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1- β (WANG et al., 2014). IL-1- β é o produto de ativação mediada por caspase pela clivagem de inflamassoma em resposta ao estresse celular (NEUMAN et al., 2007). *In vivo*, a administração do recombinante de IL-1RA, que bloqueia a ação de IL-1- β , diminuiu significativamente o desenvolvimento tumoral em modelo murinho de CAC, ratificando o papel pro-tumorigênico de IL-1- β (LEWIS et al., 2006). Assim também, foi demonstrada a ação de IL-1- β tanto nas células epiteliais intestinais (LEWIS et al., 2006) quanto diretamente nas células tumorais induzindo sua proliferação (MCALINDON; HAWKEY; MAHIDA, 1998). Além disso, IL-1- β promove o recrutamento das células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs) para o microambiente tumoral, sustentando a progressão tumoral (GARLANDA et al., 2007; WANG et al., 2014).

O acúmulo de MDSCs nos tumores também é resultado da produção de IL-6 pelas células da lâmina própria, fibroblastos associados ao câncer (CAFs) e macrófagos (CHUNG et al., 2003; GRIVENNIKOV et al., 2009). De fato, o aumento da secreção de IL-6 está atrelado a um risco elevado de desenvolver CAC, uma vez que a ligação de IL-6 em seu receptor impede apoptose (ATREYA et al., 2000) e ativa o fator de transcrição oncogênico, STAT3, que induz proliferação e progressão tumoral (HERBEUVAL et al., 2004). Destarte, IL-6 impede a reparação de danos de DNA e somado a isso, IL-6 derivada de CAFs, resulta em produção exacerbada de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), cuja

participação na promoção da angiogênese está bem estabelecida (MATSUMOTO et al., 2010).

IL-6 também está envolvida na indução da expressão de quimiocinas inflamatórias, tais como, *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 (CCL2), CCL11, CCL8, CCL20, CXCL5 e IL-9, promovendo invasão, crescimento e sobrevivência das células tumorais (TORRES et al., 2013). Ademais, IL-6 produzida por MDSCs limita o desenvolvimento de células de perfil Th1 CD4⁺ (TSUKAMOTO et al., 2013). Estudo com modelo murino de CAC, demonstrou que animais IL-6^{-/-} apresentaram números reduzidos de tumor comparados a animais *wild type*, e além disso, apresentou um aumento de apoptose e diminuição da proliferação das células epiteliais intestinais (MATSUMOTO et al., 2010).

O fator de necrose tumoral (TNF) - α apresenta um papel chave na patogênese de CAC. Apesar do TNF- α ter sido descrito classicamente como uma citocina anti-tumoral, atualmente é reconhecido que sua expressão elevada e crônica nos tecidos pode promover o crescimento tumoral, invasão e metástase (SZLOSAREK et al., 2006). O efeito de sinalização de TNF- α em CAC é decorrente da ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B, necessária para o estabelecimento de tumores associados a inflamação (BALKWILL, 2009), além de ativar células mielóides responsáveis pela promoção e progressão tumoral (POPIVANOVA et al., 2008).

O sistema imune inato e o sistema imune adaptativo orquestram juntos e sincronicamente o processo de inflamação. Assim, enquanto o sistema imune inato inicia a inflamação intestinal, o adaptativo perpetua condições de inflamação crônica. Células T CD4⁺ e CD8⁺ desempenham papéis patogênicos e protetores no desenvolvimento do CAC, dependendo de seus subconjuntos expressos (LOW et al., 2014). Células T CD8⁺ tornam-se ativadas e expressam níveis elevados de IFN- γ e *Fas ligand* (FasL) quando encontram um antígeno associado ao tumor. FasL ligada à membrana induz a apoptose de células displásicas, as quais expressam níveis aumentados de Fas ligados à superfície (ITOH et al., 1991). Adicionalmente, IFN- γ aumenta a expressão de Fas em células epiteliais colônicas e em linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano HT29, aumentando o processo de morte (XU et al., 1998). Assim também, foi demonstrado que o IFN- γ está envolvido na ativação de células T citotóxicas e células NK – importantes na resposta imunológica antitumoral (SENIK et al., 1980; STREET et al., 2002).

Embora ambos os perfis CD4⁺ Th1 e Th2 sejam os principais condutores de CD e UC, respectivamente, postula-se que citocinas derivadas de células Th2 são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de tumores, enquanto que citocinas derivadas de células Th1 são consideradas protetores para CAC (OSAWA et al., 2006). Uma vez que o sistema imunológico adaptativo falha em conter a inflamação, níveis de citocinas responsáveis pela polarização das células T CD4⁺naive preferencialmente em células Th17 em vez de Th1 se mantêm elevados (ZENEWICZ et al., 2009). Ademais, a transição de Th1 para Th17 tem como consequência a perda de produção de IFN- γ mediada por Th1, culminando em uma redução na função efetora citotóxica das células T CD8⁺ (SEIDERER et al., 2008).

O desenvolvimento de células Th17 pode ser categorizado em 3 estágios, quais sejam, I) diferenciação (TGF β , IL-6 e IL-1); II) amplificação (por IL-21); e III) estabilização (IL-23). A maior parte do efeito pró-inflamatório de Th17 tem sido atribuída à expressão de IL-17. A IL-17 é conhecida por induzir a expressão de fatores pró-inflamatórios tais como TNF- α , IL-6, IL-1, iNOS, metaloproteinases e quimiocinas, que também tem mostrado uma grande influência na inflamação e em CAC (FOUSER et al., 2008). Além disso, tem sido demonstrado que o desenvolvimento de tumores no modelo AOM/DSS foi reduzido em animais deficientes em IL17 A (GRIVENNIKOV et al., 2012), acompanhado pela diminuição da inflamação intestinal decorrente da produção de níveis diminuídos de IL-6, TNF- α e outras citocinas. Desta forma, células Th17 parecem mediar o desenvolvimento tumoral por fornecer um microambiente pró-inflamatório em vez de atuar diretamente sobre células tumorais (WALDNER et al., 2015).

Ressalta-se que a manutenção da atividade das células Th17 é dependente da produção de IL-23 pelas células dendríticas, macrófagos e neutrófilos durante a inflamação intestinal (KAMADA et al., 2008). Ou seja, na ausência de IL-23, citocinas pró-inflamatórias no cólon, como TNF- α , IL-6 e IFN- γ são reduzidas (BECKER et al., 2006). Em contrapartida, estudo mostrou que a superexpressão de IL-23 no intestino induz o aumento de inflamação e desenvolvimento espontâneo de câncer de cólon (CHAN et al., 2014), sugerindo sua atuação indireta na promoção da sobrevivência das células tumorais. Estudo apontou que a IL-23 conduz à inflamação intestinal induzindo a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-17 e IL-22 (YEN et al., 2006) e suprimindo a função de células Treg (BARNES, POWRIE; 2009).

Estudo recente demonstrou que a produção de IL-23 foi atribuída principalmente à ativação de células mielóides pela microbiota intestinal, uma vez que, os componentes da microbiota desempenham papéis importantes tanto na iniciação da inflamação quanto na regulação das células imunes da lâmina própria do intestino (MAGER et al., 2016).

Em modelos animais de colite, a microbiota ou bactérias específicas são necessárias para o desenvolvimento da inflamação e para a indução de CAC (MAGGIO-PRICE et al., 2006). Camundongos IL-10^{-/-} e camundongos TCRβ^{-/-} / p53^{-/-} não desenvolveram CCR sob ambiente *germ-free* (FUSS et al., 1996). Em um modelo de rato com função de barreira intestinal defeituosa nos locais tumorais, a translocação de produtos bacterianos foi seguida por ativação de células mielóides, indução de secreção de IL-23 e IL-17 e promoção do crescimento tumoral (REINECKER et al., 1995).

De fato, estudos reportam de modo consistente que bactérias comensais podem influenciar o sistema imune do hospedeiro, promovendo a acumulação de Th17 ou Treg na mucosa intestinal (ATARASHI et al., 2011; WANG et al., 2017). Além disso, espécies de bactérias comensais e patogênicas induzem diferentes respostas de citocinas em células epiteliais intestinais (IECs) (BAHRAMI et al., 2011; KANG et al., 2017).

1.4.2 Modelo experimental de câncer associado à colite

O Azoximetano (AOM) é um óxido de azometano amplamente utilizado para a indução de tumor de cólon em murinos. O modelo experimental de adenocarcinoma induzido por AOM reproduz as fases de iniciação e progressão do tumor que ocorrem em seres humanos (BISSAHOYO, PEARSALL et al., 2005).

Para que o AOM se encontre na sua forma reativa e atue na alteração do DNA, vários passos de ativação metabólica são necessários, quando, por fim, se obtém metilazoximetanol (MAM). O MAM é gerado no fígado e chega ao intestino através da circulação sanguínea. No intestino, há formação de compostos cancerígeno em formato eletrofílico pela ação de enzimas do tecido do cólon ou pela ação de bactérias do cólon. As bactérias são capazes também de desativar a ação cancerígena desse composto proporcionando proteção contra a indução de tumor (TANAKA et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, a utilização do AOM isoladamente é capaz de gerar adenocarcinomas, todavia, a combinação de AOM com o DSS reduz drasticamente o tempo de latência observado no modelo clássico de injeções intraperitoneais repetidas de AOM

(ROSENBERG, 2008). A administração conjunta de AOM intraperitonal com DSS na água potável de beber, provoca rápido crescimento de tumores do cólon em cerca de 10 semanas, enquanto que, nos demais modelos, o tempo de latência é de aproximadamente 30 semanas (ROSENBERG et al., 2008). O DSS isolado também é capaz de gerar adenocarcinomas, mas somente após nove ciclos intervalados e repetidos de administração, o que cria inviabiliza seu uso (OKAYASU, YAMADA et al. 2002).

1.5 Proposta terapêutica: PROBIÓTICO

O conhecimento dos efeitos benéficos da fermentação do ácido láctico na saúde humana remonta aos tempos antigos. A Bíblia menciona leite azedo várias vezes. Antigos romanos e gregos conheciam várias receitas para o leite fermentado. Um tipo específico de leite azedo, chamado "*leben raib*", preparado a partir de leite de búfala, vaca ou de cabra, foi consumido no antigo Egito. Um "*jahurt*" também foi comumente consumido por pessoas que habitavam os Balcãs. Na Índia, as bebidas com leite fermentado já eram conhecidas entre 800 e 300 anos a.C. Uma bebida de leite chamada "*ajran*" foi consumida na Rússia Central no século 12 e o "*tarho*" foi consumido na Hungria no século 14 (NG; YEUNG; TONG, 2011).

No início do século XX o cientista russo Elie Metchnikoff introduziu um estudo que concedeu a ele o prêmio Nobel de Medicina por demonstrar que *Lactobacillus bulgaricus* foi capaz de eliminar os efeitos de bactérias patogênicas da microbiota intestinal e concluiu: "*a dependência entre microrganismos intestinais e a comida faz com que seja possível a adoção de medidas as quais modificam a flora do nosso corpo substituindo os microrganismos nocivos pelos úteis*" (METCHNIKOFF, 1907).

Somente em 1965 que a palavra de origem grega "Probiótico" – "Para Vida" foi utilizada pela primeira vez por Lilly e Stillwell, os quais caracterizaram os probióticos como "*microrganismos que promovem o crescimento de outros microrganismos*" (LILLY et al. 1965). Paker (1974), ao falar sobre um alimento suplementar para gado definiu probióticos como "organismos e substâncias que auxiliam no ecossistema microbiano". Em 1989, Fuller definiu probióticos como: "microrganismos vivos com efeitos benéficos para o hospedeiro na melhora do equilíbrio intestinal" (CORCIONIVOSCHI et al. 2010).

A definição de probiótico proposta pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) / Organização Mundial de Saúde (OMS) é "*microrganismos vivos, que ao serem administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do*

consumidor” (FAO/WHO, 2002). Pesquisas realizadas com microrganismos probióticos vêm sugerindo o uso dos mesmos no tratamento e na prevenção de infecções e nos distúrbios do trato gastrointestinal (OSVATH, 2000). Além disso, determinadas linhagens promovem mecanismos de defesa no hospedeiro, sobretudo no trato intestinal caracterizados por estabilizar a microbiota local por meio de estímulos que desencadeiam respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (HEALTH, 2017).

O uso de probióticos tem como principal vantagem o efeito benéfico sobre o desenvolvimento da microbiota comensal do intestino, pois assegura um equilíbrio adequado entre os agentes patogênicos e as bactérias que são necessárias para uma função normal do organismo (OELSCHLAEGER, 2010; SCHACHTSIEK; HAMMES; HERTEL, 2004). Portanto, os probióticos podem efetivamente inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas, como *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, várias espécies de *Shigella*, *Staphylococcus* e *Yersinia*. (CARTER et al., 2017; HUSSAIN et al., 2017; OELSCHLAEGER, 2010; SCHACHTSIEK; HAMMES; HERTEL, 2004; SIKORSKA; SMORAGIEWICZ, 2013).

Além disso, os probióticos ajudam no processo de digestão, no tratamento de alergias alimentares e cárie dentária (THOMAS; GREER, 2017). Os microrganismos probióticos, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium pseudocatenulatum* são produtores naturais de vitaminas do grupo B (B1, B2, B3, B6, B8, B9, B12) (KAPLAN; NG, 2017; SIKORSKA; SMORAGIEWICZ, 2013). Eles também aumentam a eficiência do sistema imune, aumentam a absorção de vitaminas e compostos minerais e estimulam a geração de ácidos orgânicos e aminoácidos (NOVA et al., 2007).

A maioria dos microrganismos probióticos são bactérias ácido-láticas, gram-positivas, geralmente catalase-negativas, que crescem em microaerofilia. Dessa forma, os probióticos incluem espécies ácido-láticas dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus*; espécies não ácido-láticas, tais como, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii*; e contamos ainda com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (HOLZAPFEL et al., 2001; OZEN et al., 2012). Geralmente bactérias ácido-láticas produzem uma diversidade de substâncias essenciais para a saúde do

consumidor e prejudiciais para patógenos, como ácido láctico, bacteriocinas e peróxidos (SHIN et al, 2008).

1.5.1 Mecanismos de ação dos probióticos

Estudos moleculares e genéticos permitiram a determinação dos fundamentos do efeito benéfico dos probióticos, envolvendo quatro mecanismos:

- **Competição com bactérias patogênicas para adesão ao epitélio e nutrientes**

Um mecanismo geral de ação probiótica é a adesão ao epitélio intestinal, que não só estimula o sistema imunológico, mas também bloqueia a ligação de bactérias patogênicas ao epitélio e subsequente infecção. A evidência deste mecanismo foi demonstrada em vários sistemas *in vitro*, por exemplo, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* 99 e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. Todos demonstraram reduzir a adesão de espécies patogênicas ao muco intestinal humano (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; MUSA et al., 2009).

- **Supressão do crescimento de patógenos**

Alguns probióticos podem matar ou inibir diretamente o crescimento de bactérias patogênicas através de fatores antimicrobianos, como ácido láctico e acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (CHICHLOWSKI; HALE, 2008; COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; SRUTKOVA et al., 2015). A família de bacteriocinas é um grupo de proteínas que variam em tamanho, propriedades bioquímicas, alvo microbiano e modo de ação. Geralmente, elas são mais ativas contra espécies bacterianas que ocupam o mesmo nicho ecológico e, portanto, têm um espectro de morte próximo (SRUTKOVA et al., 2015). A bacteriocina invade a célula alvo através de receptores específicos da superfície celular e depois promove morte celular por vários mecanismos: formação de canais permeáveis a íons na membrana citoplasmática, inibição da síntese protéica através da clivagem específica do RNAr 16s, degradação não específica do DNA ou lise celular (SRUTKOVA et al., 2015).

Além disso, os mecanismos pelos quais os probióticos são capazes de modificar a microbiota intestinal incluem a redução do pH luminal que interferem a atividade enzimática das bactérias patogênicas (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007).

- **Modificação da resposta imune intestinal**

Certas bactérias podem interagir diretamente com células T ou podem modificar indiretamente as respostas imunes do hospedeiro através da modulação das células apresentadoras de antígeno (GIRARDIN; SEIDMAN, 2011). Além disso, os probióticos podem aumentar os níveis de células produtoras de IgA na lâmina própria e promover a secreção de IgA na camada mucosa luminal. Estes anticorpos limitam a colonização epitelial ligando as bactérias e seus antígenos, contribuindo assim para a homeostase intestinal (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010).

Alguns probióticos podem modular a expressão *in vitro* de citocinas pro- e anti-inflamatórias de uma maneira dependente da espécie. Por exemplo, *Lactobacillus sakei* induz a expressão de IL-1 β , IL-8 e TNF- α , enquanto que *Lactobacillus johnsonii* estimula a produção de TGF- β em células Caco-2 (GIRARDIN; SEIDMAN, 2011).

O probiótico *Bifidobacterium longum* regula a produção das citocinas pro-inflamatória TNF α e IL-8 e diminui a ativação de NF-kB em células mononucleares da lâmina própria dos tecidos inflamados de pacientes com colite ulcerativa (BAI et al., 2006).

- **Aumento da barreira epitelial**

Um dos mecanismos propostos de atuação dos probióticos para o tratamento das DIIs é através do fortalecimento da barreira epitelial. Numerosos estudos mostraram que os probióticos têm o potencial de modular muitos dos processos envolvidos na barreira da mucosa (DAI, 2013), acionando as vias de sinalização que levam a uma produção melhorada de muco ou defensina ou pela prevenção da apoptose (BRON; VAN BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2011).

As mucosas funcionam protegendo a superfície epitelial dos danos químicos, enzimáticos e microbianos e também demonstraram inibir a translocação bacteriana. Várias espécies de *Lactobacillus* aumentaram a expressão da mucina em linhagens celular intestinais humanas Caco-2 (MUC2) e HT29 (MUC2 e 3), bloqueando assim a invasão e adesão patogênica de *E. coli* (MACK, 2003). Ratos tratados com VSL#3 (mistura de 8 espécies diferentes de bactérias, *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Bifidobacteria longum*, *Bifidobacteria infantis* e *Bifidobacteria breve*) durante

sete dias elevou a expressão do gene MUC2 provocando um aumento no pool de mucina total (ATUMA et al., 2001).

Além disso, os probióticos podem aumentar a estabilidade das junções celulares diminuindo a permeabilidade epitelial aos patógenos e seus produtos (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010). O VSL#3 demonstrou regularizar a expressão de proteínas ocludina, ZO-1 e claudinas 1-5, protegendo assim os ratos contra a permeabilidade intestinal causada por DSS (MENNIGEN et al., 2009).

1.5.2 Gênero *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* fazem parte do grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) que participam da microbiota intestinal dos mamíferos e fermentam uma variedade de nutrientes formando ácido lático como principal produto (TANNOCK, 1999; FELIS; DELLAGLIO, 2007). Os principais gêneros de bactérias ácido-láticas são: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactosphaera* e *Oenococcus* (CARR et al., 2002).

Lactobacillus apresentam-se como eubactérias taxonomicamente pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae* (EUZÉBY, 2014), sendo o maior dentre todos os gêneros de bactérias ácido-láticas, com mais de uma centena de espécies reconhecidas. Esse gênero, altamente heterogêneo, compreende bactérias com propriedades fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas muito variáveis, que se apresentam como Grampositivo, catalase-negativo, não esporogênicas (AXELSSON, 2004; DELLAGLIO; FELIS, 2005; POT; TSAKALIDOU, 2009).

Além disso, podem ser encontradas em ambientes nos quais carboidratos estão disponíveis, como plantas, animais e alimentos (HAMMES; VOGEL, 1995; TANNOCK, 2004; CLAEISSON et al., 2008), mas preferem utilizar a lactose como fonte de carbono, pois, fermentam a lactose formando ácido lático. Considera-se homofermentação quando o produto final é quase exclusivamente ácido lático e heterofermentação quando os produtos finais são ácido lático, acético, dióxido de carbono e etanol (HAMMES; VOGEL, 1995; TANNOCK, 2004; CLAEISSON et al., 2008).

Por serem considerados seguros e dotados de grande variedade de atividade catabólica, os *Lactobacilos* são um dos mais importantes microrganismos no que diz respeito à microbiologia de alimentos e à nutrição humana devido ao fato de algumas cepas possuírem

papel fundamental na produção e preservação de alimentos, além de propriedades probióticas (CARR et al., 2002; HUYS, et al., 2006). A heterofermentação fragmenta a hexose para ácido acético, etanol e CO₂. Há um grande número dessas espécies bacterianas e algumas dominam espécies que podem produzir ácido láctico a partir de carboidratos e que o LAB não é apenas desejável para essa reação, mas também é necessário para sua promoção (HAMMES; VOGEL, 1995; TANNOCK, 2004; CLAEISSON et al., 2008).

As BAL podem produzir bacteriocinas que têm como alvo principal as bactérias gram-positiva, podendo também atuar contra bactérias da mesma espécie ou contra bactérias de outros gêneros (COTTER et al., 2005). As bacteriocinas das BAL são um grupo heterogêneo de compostos antimicrobianos, de natureza peptídica, formados por 20 a 60 resíduos de aminoácidos, com características anfipáticas e ponto isoelétrico elevado. Esses peptídeos são distintos dos antibióticos na sua síntese, modo de ação, espectro de atividade, massa molecular, propriedades bioquímicas, mecanismos de resistência, toxicidade e origem genética (CAROLISSEN-MACKAY et al., 1997). Está comprovado que ocorre um ótimo potencial de inibição, de *Lactobacillus acidophilus* contra bactérias patogênicas como *Clostridium perfringens*, causador de enterite necrótica, *Salmonella* e *E. coli* (BRUNO; MONTVILLE, 1993; CLEVELAND et al., 2001; HAN et al., 2007).

1.6 Jutificativa

As doenças inflamatórias intestinais são processos crônicos prevalentes que acometem o trato intestinal de indivíduos susceptíveis. Tais manifestações clínicas apresentam períodos de remissões e recidivas, não existindo cura para as mesmas, uma vez que, a sua ocorrência é mediada por fatores genéticos, além dos fatores ambientais e imunológicos. O tratamento padrão baseia-se no uso de anti-inflamatórios ou anticorpos monoclonais que podem ter efeitos adversos sistêmicos quando utilizados de forma prolongada. Além disso, muitos pacientes desenvolvem resistência ao tratamento.

A associação entre o microambiente observado nas DIIs e o desenvolvimento do CAC têm levantado questionamentos sobre o papel da inflamação e de mediadores inflamatórios na formação, progressão, proteção ou combate a diferentes tipos de tumor.

Há evidente aumento no interesse em investigar maneiras de contornar alterações da resposta imunitária do hospedeiro à disbiose microbiana utilizando suplemento à base de microrganismos vivos. Isso ocorre, uma vez que estudos com probióticos têm demonstrado

um grande potencial imunomodulador, manutenção de períodos prolongados de remissão de DIIs e a ausência de resistência ao tratamento, devido ao fato da utilização de micro-organismos naturalmente encontrados na microbiota comensal, como é o caso das *Bifidobactérias* e dos *Lactobacilos*.

Além disso, a própria Organização Mundial da Saúde tem sugerido o uso de terapias alternativas ao uso de antibióticos. A indicação de probióticos em casos de DIIs é fundamentada em uma série de estudos em animais e em humanos indicando que a microbiota intestinal possui um papel central na patogênese de doença de Crohn e colite ulcerativa.

Apesar das evidências da atuação de probióticos em DIIs, pouco se sabe sobre seu papel em CAC. Por esse motivo, propusemos estudar os *Lactobacillus bulgaricus* no câncer retal associado à inflamação. A escolha de *Lactobacillus* deveu-se ao fato desse gênero ser um dos membros dominantes da microbiota humana e reconhecido por seu efeito benéfico em diversos distúrbios gastrointestinais.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar a atividade de *Lactobacillus bulgaricus* na modulação da resposta imune na colite experimental e na carcinogênese colorretal associada à inflamação (CAC).

- ❖ Avaliar o papel do *Lactobacillus bulgaricus* na colite experimental e CAC por meio de análise clínica e histopatológica do desenvolvimento da inflamação intestinal.
- ❖ Estudar os efeitos de *Lactobacillus bulgaricus* no acúmulo de células e infiltrado inflamatório na colite experimental e em CAC.
- ❖ Avaliar o papel do *Lactobacillus bulgaricus* na modulação da resposta imunológica relacionada ao desenvolvimento da colite e CAC por meio da avaliação da produção de citocinas, com ênfase nas subpopulações de células Th1 e Th17.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Utilizamos camundongos do tipo selvagem C57BL/6, machos, entre 4-6 semanas de idade e pesando entre 20-25g obtidos do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram ambientados e mantidos em mini isoladores de estantes ventiladas (5 ou 10 animais por gaiola) no Biotério da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (EERP-USP) em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo de 12/12 horas e água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos propostos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e certificados pelo protocolo no 14.1.418.53.1 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto (CEUA PUSP-RP).

3.2 *Lactobacillus Bulgaricus*

A linhagem bacteriana *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* utilizada neste estudo tem número de lote FK0201, identificação LB-G040, origem chinesa. A cultura foi identificada e confirmada de acordo com o nível de gênero/ espécie baseado na sequência 16s rRNA. O probiótico foi mantido em recipiente fechado, em lugar fresco e a 20°C .

3.3 Indução da colite por DSS

Através de gavagem, os animais receberam o tratamento com probiótico ou PBS por três dias intervalados. Após esse período foi disponibilizada aos camundongos de maneira exclusiva e *ad libitum* por sete dias consecutivos água contendo dextran sulfato de sódio (DSS) 2,7% (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA) com o objetivo de induzir inflamação intestinal. Os animais foram eutanasiados entre os dias 8 e 10 após início da colite. O tratamento com probiótico ou PBS se manteve durante toda essa etapa.

Figura 2. Modelo experimental indução de colite. Probiótico ou PBS foram administrados por gavagem nos primeiros sete dias aos camundongos experimentais, sendo que, após esse período solução de DSS 2,7% foi oferecida *ad libitum* na água potável de beber.

3.1.1 Caracterização macroscópica e microscópica da colite

De acordo com Sales-Campos et al., 2015 os sinais clínicos da inflamação intestinal foram determinados por dois investigadores, de forma independente. Foi adotado um sistema de pontuação no qual um ponto (1,0) foi atribuído a cada sinal apresentado pelo camundongo: perda de peso $\geq 5\%$ e $< 10\%$ do peso corporal comparado ao dia anterior; constatação da região perianal umidecida; presença de diarreia; sangue nas fezes ou região perianal; hiporreatividade e piloereção. Quando da perda de peso $\geq 10\%$, 2 pontos foram atribuídos ao sinal “perda de peso”. Por fim, a somatória final desses pontos determinou o *score* clínico da doença ou inflamação (tabela 1).

Tabela 1. Sinais clínicos avaliados para determinação do score clínico da inflamação intestinal

Sinais clínicos observados	Pontuação
Normal	0
Região perianal umidecida	1
Diarreia	1
Sangue nas fezes ou região perianal	1
Perda de peso $\geq 5\%$ e $< 10\%$ *	1
Perda de peso $\geq 10\%$ *	2
Hiporreatividade	1
Piloereção	1

*Perda de peso em relação ao dia anterior

O score clínico de cada animal foi determinado, diariamente, após exposição ao DSS nos experimentos de colite, enquanto que intervalos de tempos previamente determinados foram avaliados ao decorrer dos ciclos de DSS para indução de CAC.

Especificamente, verificamos os sinais clínicos sempre entre os dias 5 e 11 após início do DSS e uma vez a cada semana de intervalo de água normal. No caso dos experimentos de lesão pré-neoplásica, o peso foi verificado pelo menos semanalmente.

Amostras do cólon de camundongos foram fixadas em formalina tamponada 10% e incluídos em parafina e foram analisados através de cortes histológicos de 4µm de espessura, corados por Hematoxilina e Eosina (H&E). Para colite induzida por DSS, as avaliações incluíram a arquitetura anatômica da camada mucosa; presença, extensão e tipo do infiltrado inflamatório na lâmina própria, e presença de erosões e/ou ulcerações. As imagens obtidas foram fotografadas usando-se uma câmera acoplada ao microscópio. As análises histopatológicas e morfométricas foram realizadas em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Mariângela Ottoboni Brunaldi, patologista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.

3.4. Câncer colorretal associada à colite (CAC) induzido por AOM e DSS

Através de gavagem, os animais receberam o tratamento com probiótico ou PBS por três dias intervalados. Após esse período, para a indução de CAC, adotamos com 3 ciclo de DSS e eutanásia dos animais entre a 9^a a 15^a semana após indução. Os camundongos foram injetados i.p. com dose única (10 mg/kg em 300µl de solução) de AOM (Sigma-Aldrich), seguidos por 3 ciclos de uma semana de 2,5% de DSS adicionado à água de beber dos animais e intercalados por 2 semanas de água normal (TANAKA et al., 2003; ROSENBERG; GIARDINA; TANAKA, 2009; WALDNER; NEURATH, 2009). Para o controle negativo, os animais foram injetados com PBS e receberam somente água. Nestes experimentos, os camundongos foram eutanasiados entre a 9^a e 12^a semanas após início da indução de CAC.

Figura 3 Modelo experimental indução de câncer colorretal associada à colite. O protocolo experimental consistiu em injeção i.p. de dose única (10 mg/kg) de AOM seguida de 3 ciclos de DSS intercalados por duas semanas de água normal. Animais do grupo controle foram injetados com PBS e receberam somente água. O tratamento foi feito por gavagem, 3 vezes por semana com Probiótico ou PBS durante todo período experimental. Os animais foram eutanasiados no 70^a dia.

3.4 Administração de probiótico *in vivo*

Para o tratamento dos animais, probiótico 10^9 CFU de *Lactobacillus bulgaricus* foi dissolvido em PBS nas concentrações e administrado por gavagem (200 μ l) para se garantir que todos os camundongos recebessem as doses completas. De maneira resumida, as estratégias terapêuticas adotadas foram as seguintes: (1) tratamento contínuo por todo o período do experimento de colite; (2) tratamento contínuo e 3 vezes por semana para camundongos dos experimentos de avaliação de tumores colorretais. Animais do grupo controle receberam apenas PBS.

3.5 Eutanásia

Ao final de cada experimento, os animais foram devidamente eutanasiados por sobredose anestésica (xilazina e quetamina) ou deslocamento cervical. Em seguida, amostras de sangue (soro), intestino (cólon), baço e/ou linfonodos mesentéricos (LNM) foram coletadas para análises posteriores.

3.6 Análise do comprimento do cólon

A gravidade da inflamação intestinal foi também avaliada pela medição do comprimento de toda extensão do intestino grosso. Para tanto, após eutanásia, os cólons dos camundongos experimentais foram coletados entre a junção ileocecal e o reto proximal, colocados cuidadosamente sobre uma superfície limpa e fotografados com auxílio de câmera fotográfica. As imagens foram calibradas pela presença de uma régua graduada que serviu como escala para as análises. Posteriormente, as imagens dos intestinos grossos foram avaliadas pelo uso do *software* ImageJ.

3.7 Avaliação da área, volume, incidência e multiplicidade tumoral

Após eutanásia, os cólons dos animais foram longitudinalmente abertos, lavados, fotografados e examinados quanto à presença de tumores. A incidência e multiplicidade dos tumores foram verificadas para cada animal e grupo experimental. As dimensões dos tumores colorretais foram medidas com paquímetro e os volumes calculados como: $(\text{largura})^2 \times \text{comprimento} / 2$ (DOUGHERTY et al., 2011). Para determinação da área tumoral, os cólons foram colocados cuidadosamente sobre uma superfície limpa e fotografados com auxílio de câmera fotográfica. As imagens foram calibradas pela presença de uma régua graduada que

serviu como escala para as análises. Posteriormente, as imagens dos intestinos grossos foram avaliadas pelo uso do software ImageJ.

3.8 Avaliação microbiológica de amostras fecais

A composição da microbiota fecal foi analisada ao final do experimento de colite em colaboração com o grupo de pesquisa da Prof^ª. Dr^ª. Katia Sivieri, docente da UNESP de Araraquara. Resumidamente, após eutanásia, os cólons foram longitudinalmente abertos, as fezes coletadas e acondicionadas em gelo seco até o momento da análise.

A análise baseou-se na determinação da população de bactérias de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. e bactérias anaeróbias totais. Para tanto, as amostras de fezes foram diluídas e inoculadas em meios de cultura seletivos: aeróbios e anaeróbios totais (ágar Standard Methods - Acumedia, EUA; 37°C/48h); *Enterococcus* spp. (ágar KF *Streptococcus* - Acumedia, EUA; 37°C/48h) (EDLUND et al., 2000); *Lactobacillus* spp. (ágar MRS, Merck, Alemanha; 37°C/48h, anaerobiose) (YOSHIOKA, ISEKI, FUJITA, 1983); *Bifidobacterium* spp. (*Bifidobacterium* medium 25 – BIM- 25, 37°C/72h, anaerobiose) (MUNOA; PARES, 1988), *Enterobactérias* (ágar MacConkey - Acumedia, EUA; 37°C/48h) (BRIGIDI et al., 2001); *Clostridium* spp. (ágar RCA – Difco, França; 37°C/48h, anaerobiose) (MARZOTTO et al., 2006); *Bacteroides* spp. (ágar BBE - Acumedia, EUA; 37°C/72h, anaerobiose) (LIVINGSTON et al., 1978).

3.9 Análise histopatológica

No que concerne a análise histológica da carcinogênese induzida por AOM e DSS, os tumores colorretais foram examinados quanto ao tipo de lesão neoplásica, presença e grau de displasia epitelial, além de presença de atividade inflamatória aguda, caracterizada por infiltrado de células polimornucleares, e/ou inflamação crônica (presença de células mononucleares).

3.10 Dosagem de citocina

A determinação do perfil de citocinas produzidas no cólon dos animais experimentais foi realizada a partir de homogenato de segmento colônico. Para tanto, os tecidos foram coletados, pesados e imediatamente homogeneizados em PBS na presença de inibidores de proteases (Roche) utilizando-se homogeneizador de tecidos (Polytron System PT 1200E). O material foi então centrifugado a 14000 x g, por 15 min à 4°C e o sobrenadante coletado,

aliquotado e armazenado a -80°C até o momento da dosagem. As concentrações das citocinas $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-12(p70), IL-17, IFN- γ , IL-1 β , IL-10, TGF- β , IL-23 foram determinados pela técnica de ELISA sanduiche, com kits BD OptEIA™ (BD Biosciences Pharmingen) ou DuoSet (R&D Systems). O protocolo foi realizado segundo orientações dos fabricantes. As concentrações de citocinas foram determinadas com referência à reta de regressão linear obtida com os dados relativos às diluições seriadas de cada citocina recombinante de camundongo.

3.11 Isolamento de células colônicas

Para fenotipagem das células colônicas, células presente na mucosa colônica foram isoladas através da técnica de dissociação enzimática do cólon. Brevemente, os segmentos colônicos foram removidos e, em seguida, abertos longitudinalmente e lavados com solução de PBS para remoção das fezes. Os tecidos foram então cortados em pequenos pedaços (cerca de 0,5cm), os quais foram transferidos para tubos de 50ml contendo 10ml de meio RPMI. Para remoção das células epiteliais intestinais (CEI), os cólons foram lavados 2x com PBS gelado e incubados com solução de EDTA (5,2mM) em agitador orbital (120rpm) durante 1h a temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as amostras foram vigorosamente agitadas e lavadas 2x com PBS contendo 2% de soro bovino fetal (SBF). O sobrenadante dessa incubação contendo as células epiteliais foi descartado após filtração dos pedaços tecidos em filtros de $70\mu\text{m}$. Em seguida, os tecidos remanescentes dessa primeira etapa foram transferidos para tubos de 2ml contendo collagenase D (1mg/ml) (Roche). Nesse momento, os cólons foram cortados em pedaços menores com auxílio de uma tesoura cirúrgica fina para acelerar e facilitar o processo de digestão enzimática induzida por colágena D. A digestão foi realizada por 1h a 37°C . Após completa digestão do tecido, a suspensão células foi então filtrada com filtros de $40\mu\text{m}$ (BD Falcon) e centrifugada a $14000 \times g$ por 10 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1ml de PBS contendo 2% de SBF. O número de células foi determinado através do método de exclusão com azul de Tripán em hemocitômetro.

3.12 Análise do perfil fenotípico das células imunes infiltrantes do cólon ou presentes nos linfonodos mesentéricos (citometria de fluxo)

A caracterização fenotípica de linfócitos T e células mielóides presentes no cólon ou nos linfonodos mesentéricos foi realizada por citometria de fluxo. Suspensões celulares de

2×10^6 foram transferidas para tubos de 1,5ml e centrifugadas a $12042 \times g$ por 1 min a 4°C . O sobrenadante foi então descartado e as células ressuspensas em PBS 2% SBF ou 150 μl de tampão de fixação (PBS/Formol 4%) quando necessário. Após este período, as células foram lavadas 2x com PBS e uma vez com tampão de permeabilização (PBS/SBF 1%/Azida Sódica 1%/Saponina 0.2%). Em seguida, após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células bloqueadas com 10% de soro de coelho por 20min a 4°C . Ao final da etapa do bloqueio, as células foram marcadas com diferentes combinações de anticorpos monoclonais conjugados contra os marcadores de superfície CD3, CD4, CD8, CD25, CD11b, CD11c, Ly6G, Ly6C, Gr1, MHC II, F4/80 e/ou intranuclear Foxp3. Para marcação específica do fator de transcrição Foxp3, utilizamos kit adequado para permeabilização da membrana nuclear (*Foxp3 Staining Buffer Set* – eBioscience). A incubação com quaisquer dos anticorpos foi realizada durante 30min, no escuro a 4°C . Em seguida, as amostras foram então lavadas duas vezes com PBS/0,5% BSA e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo (FACSCanto II ou LSR Fortessa, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). As análises foram realizadas utilizando-se programa FACSDiva versão 6.1.3.

3.13 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de computador Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Primeiramente, os resultados foram submetidos ao teste de normalidade a fim de avaliar se os mesmos apresentavam distribuição Gaussiana. Amostras paramétricas foram analisadas por meio de teste estatístico ANOVA *One-way* seguido de pós-teste de Tukey, enquanto que as não paramétricas por ANOVA *One-way* seguida do pós-teste de Comparações Múltiplas de Dunn. A probabilidade foi considerada estatisticamente significativa se $p < 0,05$. Todos os resultados foram expressos como Média $\pm$ EPM.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos do probiótico *Lactobacillus bulgaricus* na colite experimental induzida por DSS

➤ Acompanhamento do peso corporal

O peso dos animais experimentais foi verificado antes do início do pré-tratamento com *L. bulgaricus* ou PBS (dia 0) e, à partir do 2º dia do início do DSS (dia 5), todos os dias até o final do experimento. Como esperado, a ingestão do polissacarídeo levou a uma redução gradativa do peso corporal dos animais pela indução de inflamação, sendo que ao final do protocolo (dia 12), todos os camundongos perderam cerca de 25% de seus respectivos pesos corporais iniciais (Figura 4). Todavia, interessante, os animais que foram tratados com *L. bulgaricus* perderam menos peso que os animais controle nos dias 5, 10 e 11 (Figura 4).

Figura 4. Acompanhamento do peso corporal de animais submetidos ao protocolo de colite induzida por DSS. O peso corporal (em gramas) foi verificado no início do protocolo experimental e diariamente após início da indução de colite aguda e utilizado para cálculo do peso relativo referente ao primeiro dia do protocolo experimental. Peso relativo dos animais controle (não induzidos ou sem colite - A) e que receberam DSS (B). Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$.

➤ Determinação do score clínico de inflamação intestinal

Os sinais clínicos da colite foram também utilizados para avaliar a inflamação intestinal nos fornecendo informações acerca da gravidade da doença *in vivo*. Por meio da avaliação diária dos animais, observamos que o grupo tratado com o probiótico começou a exibir os primeiros sinais clínicos da colite mais tardiamente que o grupo controle (Figura 5), além de exibir um menor *score* clínico ou menor gravidade da doença durante todo o período experimental (Figura 5).

Figura 5. Determinação do score clínico da colite experimental induzida por DSS de animais tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. O score clínico foi determinado pela somatória de pontos atribuídos aos sinais clínicos perda de peso, região perianal umidecida, presença de diarreia, sangue nas fezes ou região perianal, hiporreatividade e piloereção. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

➤ Análise do comprimento do cólon

Embora o comprimento do cólon seja um parâmetro que pode fornecer informações acerca da inflamação intestinal, não observamos diferença entre o grupo controle e os animais que receberam *L. bulgaricus* (Figura 6).

Figura 6. Determinação do comprimento do cólon ao final do protocolo de colite induzida por DSS. (A) Após eutanásia, os cólons dos camundongos foram coletados e fotografados com régua graduada para determinação do comprimento do cólon por meio do uso do software ImageJ. (B) Imagens ilustrativas da extensão dos cólons. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. ** $p < 0,01$.

➤ Avaliação das alterações histopatológicas do cólon

Uma vez que observamos redução do score clínico da colite em animais tratados com *L. bulgaricus*, também fizemos uma análise histopatológica dos cólons. Como ilustrado na figura 7, não observamos grandes diferenças entre os grupos controle e tratado com o probiótico. De forma geral, a exposição ao DSS induziu uma disruptura do revestimento epitelial, destruição total ou parcial de criptas, pronunciado infiltrado inflamatório na lâmina própria com presença concomitante de células polimorfo e mononucleares, erosões e/ou ulcerações e acentuado edema na camada submucosa (Figura 7).

Figura 7. Fotomicrografias de cólons de animais não doentes e animais submetidos ao protocolo de colite e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. Ao final do protocolo experimental de colite induzida por DSS (12º dia), amostras de cólon foram coletadas, fixadas, incluídas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica da estrutura tecidual e presença de processo inflamatório (H&E, 40X e 100X).

➤ **Determinação da concentração intestinal de citocinas produzidas em condição de colite experimental**

A fim de melhor entendermos o fenótipo atenuado de colite de animais tratados com *L. bulgaricus*, determinamos a concentração intestinal de importantes mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da colite. O tratamento com o probiótico estudado levou a uma menor produção de todas citocinas pró-inflamatórias avaliadas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-23, IFN- γ , IL-12p70), embora nenhuma diferença tenha sido observada para a citocina anti-inflamatória TGF- β (Figura 8). A redução dos níveis de IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α e IL-23 ocorreu numa ordem de 2; 8,4; 1,6; 3,5; 1,5; 1,7 e 2 vezes, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Figura 8).

Figura 8. Perfil de citocinas intestinais produzidas por animais submetidos à colite e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. Fragmentos de cólons foram homogeneizados e a concentração das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IL-23, IFN- γ , IL-12p70 e TGF- β (por grama de tecido) foi determinada por ELISA. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

➤ Caracterização do perfil de células imunes presentes no cólon ou presentes nos linfonodos mesentéricos após tratamento com *Lactobacillus bulgaricus*

Determinamos, por citometria de fluxo, a porcentagem das populações de linfócitos T e células imunes inatas (mielóides) presentes no cólon ou nos linfonodos mesentéricos, órgãos drenantes do local de inflamação. Quando o número de células isoladas do cólon foi limitado, analisamos os linfonodos dos animais experimentais.

Conforme ilustrado na figura 9A e C, não observamos diferença entre os grupos no que concerne a porcentagem de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Por outro lado, observamos uma redução de 48% na frequência de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ isolados de animais tratados com *L. bulgaricus* em comparação aos controles (Figura 9).

Figura 9. Quantificação de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e reguladores presentes no cólon e/ou linfonodos mesentéricos de animais submetidos à colite e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. Leucócitos foram isolados do cólon ou linfonodos mesentéricos e marcados com anticorpos específicos por citometria de fluxo. A frequência de linfócitos T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) foi determinada no cólon e Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) (C) nos linfonodos pela porcentagem dentro da população CD3⁺. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. **p<0,01.

Dentre as populações de células imunes inatas mielóides, não observamos diferenças na porcentagem de células dendríticas CD11b⁺CD11c⁺ (DCs), células dendríticas derivadas de monócitos CD11b⁺CD11c⁺ (MDDCs), neutrófilos Ly6G⁺Ly6C⁻ e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC) Ly6G⁺Ly6C⁺ (Figura 10 A, B, D e E, respectivamente). Todavia, demonstramos que animais tratados com *L. bulgaricus* exibiram uma menor frequência de macrófagos F4/80⁺MHCII⁺ isolados do cólon em relação ao grupo controle (Figura 10).

Figura 10. Quantificação de células mielóides presentes no cólon de animais submetidos à colite e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. Leucócitos foram isolados do cólon e marcados com anticorpos monoclonais específicos para identificação e determinação da frequência de células dendríticas CD11b⁻CD11c⁺ (A), células dendríticas derivadas de monócitos CD11b⁺CD11c⁺ (B), macrófagos F4/80⁺MHCII⁺ (in CD11b⁺) (C), neutrófilos Ly6G⁺Ly6C⁻ (in CD11b⁺MHCII⁻) (D) e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC) Ly6G⁺Ly6C⁺ (in CD11b⁺MHCII⁻) (E) por citometria de fluxo. Resultados expressos como Média ± EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. *p<0,05.

➤ Avaliação da composição da microbiota fecal

Dada a importância da microbiota na etiologia e patogênese de DII, fizemos uma quantificação de populações de bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. e bactérias anaeróbias totais em amostras fecais dos animais expostos ao DSS. Observamos que o tratamento de camundongos com probiótico resultou numa diminuição na ordem de 10⁵ UFC/g de amostra no grupo de bactérias anaeróbias totais (Tabela 3). Entretanto, nenhuma diferença foi observada após quantificação dos gêneros isolados de bactérias (Tabela 3).

Tabela 2. Avaliação da composição da microbiota fecal de animais submetidos à colite experimental e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*.

	PBS	Lb
<i>Clostridium</i> spp.	8,67±0,47	8,62±0,24
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,49±0,52	8,35±0,20
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,65±0,38	7,99±0,49
Anaeróbios Totais	8,65±0,33	7,68±0,31**

Quantificação em log₁₀ UFC/g de fezes. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. **p<0,01

4.2 Efeitos de *Lactobacillus bulgaricus* na carcinogênese em modelo in vivo de CAC

Dada a evidente atividade da anti-inflamatória de *Lactobacillus bulgaricus* em modelo de colite experimental induzida por DSS, objetivamos avaliar se o probiótico poderia inibir a progressão tumoral de CAC pela regulação da inflamação intestinal em modelo induzido por AOM e DSS.

➤ Acompanhamento do peso corporal

Para avaliar se a administração de *L. bulgaricus* poderia inibir a progressão tumoral induzida por AOM e DSS, avaliamos inicialmente se o tratamento poderia interferir com o peso corporal dos animais induzidos. Para tanto, fizemos um acompanhamento do peso corporal ao longo de todo período experimental. De modo geral, ambos os grupos apresentaram um perfil de perda e ganho de peso característico do modelo experimental, no qual após exposição ao DSS, os animais perdem peso devido à indução de inflamação intestinal, e voltam a ganhar peso após substituição do detergente por água (Figura 11). De fato, não observamos diferenças entre o grupo controle e tratado com o probiótico em nenhum momento do protocolo experimental (Figura 11).

Figura 11. Acompanhamento do peso corporal de animais submetidos ao protocolo de CAC. O peso corporal (em gramas) foi verificado no início do protocolo experimental e diariamente após início da indução de colite aguda e utilizado para cálculo do peso relativo referente ao primeiro dia do protocolo experimental. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM.

➤ Determinação do score clínico de inflamação intestinal

Observamos que o grupo de animais tratados com *L. bulgaricus* apresentou menor *score* clínico no 13º e 15º dias do protocolo de indução tumoral com AOM e DSS (Figura 12). A partir de então, esse padrão de resposta se estendeu e passou a ser ainda mais acentuado até o final dos 70 dias experimentais (Figura 12). Tais diferenças ocorreram especificamente nos dias 35, 36, 47, 54, 56, 57 e 63, como ilustrado na figura 12.

Figura 12. Determinação do score clínico da inflamação intestinal em animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. O score clínico foi determinado pela somatória de pontos atribuídos aos sinais clínicos perda de peso, região perianal umidecida, presença de diarreia, sangue nas fezes ou região perianal, hiporreatividade e piloereção ao longo de todo o período experimental. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

➤ Análise do comprimento do cólon

Adicionalmente a redução do score de inflamação intestinal, observamos que o tratamento com *L. bulgaricus* atenuou o encurtamento dos cólons induzido pelo DSS (Figura 13). Animais do grupo controle apresentaram uma menor extensão do cólon quando comparados ao grupo que recebeu o probiótico (Figura 13).

Figura 13 Determinação do comprimento do cólon de animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. (A) Após eutanásia, os cólons dos camundongos foram coletados e fotografados com régua graduada para determinação do comprimento do cólon por meio do uso do software ImageJ. (B) Imagens ilustrativas da extensão dos cólons. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. ** $p < 0,01$.

➤ Determinação da concentração intestinal de citocinas produzidas em cólons e tumores de animais induzidos com AOM/DSS

Para o experimento de câncer colorretal associado à colite avaliamos isoladamente a concentração de citocinas no cólon inflamado e nos tumores colorretais. Primeiramente, analisamos segmentos do intestino grosso que não apresentavam tumores (cólon inflamado) observamos redução numa ordem de pelo menos 2 vezes nos níveis intestinais das citocinas TNF- α , IL-1, IL-23 e IL-17 em animais tratados com *L. bulgaricus* quando comparados aos controles (Figura 14). Em contrapartida, concentrações aumentadas de IFN- γ também foram observadas nesses animais tratados (Figura 14). Não observamos nenhuma diferença entre os grupos para a citocina IL-6 (Figura 14).

Figura 14. Perfil da produção intestinal de citocinas animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. Segmentos do cólon foram homogeneizados e a concentração de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IFN- γ e IL-23 por grama de tecido (cólon) foi determinada por ELISA. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

No que concerne a dosagem de citocinas dos tumores colorretais, observamos padrão muito parecido ao encontrado nos cólons inflamados. Em adição as citocinas negativamente reguladas nos cólons (TNF- α , IL-1, IL-23 e IL-17), nos tumores também observamos concentrações diminuídas de IL-6 (Figura 14) em camundongos tratados com o probiótico. Em adição, demonstramos novamente aumento dos níveis de IFN- γ induzido pelo tratamento com *L. bulgaricus* (Figura 15).

Figura 15. Perfil da produção citocinas em tumores de animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. Segmentos do cólon foram homogeneizados e a concentração de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IFN- γ e IL-23 por grama de tecido (cólon) foi determinada por ELISA. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. *p<0,05, **p<0,01, p<0,001.

➤ Incidência e quantificação dos tumores colônicos

Por fim, avaliamos se o tratamento com *Lactobacillus bulgaricus* seria capaz de inibir a progressão do câncer associado à colite em animais induzidos com AOM e DSS. Conforme ilustrado na figura 15, animais de ambos os grupos desenvolveram tumores ao final do protocolo experimental, sendo que aqueles tratados com o probiótico desenvolveram menos tumores, sendo eles de menor volume (Figura 16 A, B, C e D). Camundongos do grupo controle desenvolveram, em média, 9 tumores colorretais, enquanto que os animais submetidos ao tratamento com *L. bulgaricus* desenvolveram apenas 3 (Figura 16A). Observamos também um volume tumoral total cerca de 4,4 vezes menor nesses animais tratados (Figura 16B). Ademais, os animais que receberam o probiótico exibiram tumores com volume médio 3 vezes menor que o grupo controle (Figura 16B). Não observamos nenhuma diferença no que concerne a incidência de tumores (dados não mostrados).

Figura 16. Efeitos do tratamento com *Lactobacillus bulgaricus* no desenvolvimento de tumores em modelo murino de CAC. Após eutanásia, os cólons dos animais foram longitudinalmente abertos, lavados, fotografados e examinados quanto a multiplicidade de tumores (A), volume tumoral total (B) e volume tumoral médio (C). As dimensões dos tumores colorretais foram medidas com paquímetro e os volumes calculados como: $(\text{largura})^2 \times \text{comprimento} / 2$. (D) Imagens ilustrativas dos tumores presentes nos cólons dos animais submetidos à ação de AOM/DSS. Volume tumoral total indica a soma dos volumes de todos os tumores encontrados em cada cólon. Média do volume tumoral refere-se ao tamanho médio dos tumores, ou seja, volume tumoral total dividido pelo número de tumores de cada cólon. Resultados expressos como Média $\pm$ EPM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

➤ Análise histopatológica dos tumores colorretais

Após avaliação histopatológica das secções tumorais, observamos que, independentemente do tratamento com *L. bulgaricus*, ambos os grupos de camundongos submetidos à carcinogênese apresentaram lesões neoplásicas morfologicamente semelhantes. De modo geral, os tumores colorretais eram lesões do tipo adenoma polipóide com variação entre baixo e alto grau de displasia e inflamação mista, ou seja, presença concomitante de infiltrado de células polimorfo e mononucleares (Figura 17A, B e C).

Figura 17. Fotomicrografias de secções tumorais de animais submetidos ao protocolo de CAC e tratados com *Lactobacillus bulgaricus*. Secções tumorais foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina e submetidas à análise histopatológica sob microscópio óptico de luz. Fotomicrografia ilustrativa de adenoma polipoide registrada com aumento de 40X (A), 100X (B) e 200X (C).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Evidências crescentes indicam que a inflamação desempenha um papel importante na promoção da carcinogênese. No presente estudo, utilizamos modelo experimental de colite e câncer colorretal associado à inflamação para investigar os efeitos do probiótico *L. bulgaricus* sobre o desenvolvimento dessas doenças. Na colite experimental, *L. bulgaricus* exibiu um papel anti-inflamatório, suprimindo o crescimento de bactérias anaeróbias e atenuando os sinais em associação à redução das citocinas TNF- α , IL-6, IL-1, IFN- γ , IL-17, IL-23 e IL-12, da frequência de macrófagos presentes no cólon e de linfócitos TCD8⁺. Na carcinogênese, o probiótico regulou negativamente o desenvolvimento de tumores, resultando em redução expressiva do volume tumoral total e tamanho médio de tumores ao final do tratamento. Além disso, atenuou os sinais clínicos da inflamação intestinal, assim como induziu, concomitantemente, menor produção intestinal das citocinas IL-6, TNF- α , IL-17, IL-23 e IL-1 β e aumento de IFN- γ . Em conjunto, nossos resultados evidenciam papel anti-inflamatório e consequente efeito antitumoral de *L. bulgaricus* na carcinogênese colorretal associada à inflamação.

Há mais de 150 anos, Rudolph Virchow conceituou pela primeira vez a estreita ligação entre o desenvolvimento de câncer e o processo inflamatório a partir de observações feitas em tecidos tumorais que apresentavam aumento do infiltrado de células imune e proliferação celular (MANTOVANI A., 2001; VIRCHOW R., 1881). Foi somente durante a última década que evidências claras foram obtidas em relação ao papel crítico que a inflamação desempenha na tumorigênese (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; KARIN, 2006). Atualmente, sabe-se que uma resposta imune bem equilibrada pode ser antitumorigênica; no entanto, uma resposta inflamatória prolongada ou crônica é geralmente prejudicial (CANDIDO; HAGEMANN, 2013; HARTNETT; EGAN, 2012).

Em muitos órgãos cronicamente inflamados do trato gastrointestinal é possível estabelecer conexão ao desenvolvimento de câncer. Os primeiros relatos de câncer colorretal em pacientes com doença intestinal inflamatória ocorreu no início dos anos 1900, quando Crohn e Rosenberg descreveram um caso de adenocarcinoma colônico em paciente com colite ulcerativa de longa duração (CROHN; ROSENBERG, 1925). Pacientes com doença intestinal inflamatória, incluindo colite ulcerativa e doença de Crohn, apresentam um risco vitalício de 2 a 3 vezes maior de desenvolver câncer colorretal em comparação com a população em geral (COUSSENS; WERB, 2002; HARTNETT; EGAN, 2012; WALDNER; NEURATH, 2015a).

Terapia convencional de drogas utilizada em DII visa principalmente suprimir a resposta imune para induzir ou manter a remissão. Os medicamentos comumente usados incluem corticosteróides, aminosalicilatos e supressores imunes como metotrexato e azatioprina. No entanto, apenas cerca de um terço dos pacientes obterá remissão e muitos dos respondentes primários acabarão por perder sua resposta ao longo do tempo (BOUMA; STROBER, 2003; HARTNETT; EGAN, 2012).

Considerando que esses pacientes precisam de tratamento ao longo da vida e muitas das terapias disponíveis têm efeitos colaterais secundários, a busca de novas abordagens continua (DEL CARMEN et al., 2017). Tratamentos que manipulam a composição e/ou atividade de microbiota intestinal, como intervenções com probióticos e prebióticos, podem constituir uma opção terapêutica alternativa (AMBALAM et al., 2016; HOOPER; LITTMAN; MACPHERSON, 2012; WINTER et al., 2005). Entre os probióticos, *Lactobacillus* foram relatados por exercer efeitos imuno-reguladores, incluindo modulação de respostas imunes inatas e promoção da imunidade humoral e celular (CUNNINGHAM-RUNDLES et al., 2000; DELCENSERIE et al., 2008), supressão do crescimento de patógenos e restauração da homeostase da microbiota intestinal (COLLINS; GIBSON, 1999), além de melhorar os sinais clínicos de doenças inflamatórias intestinais (CHUNG et al., 2008; LEE et al., 2010, 2009; PERAN et al., 2007).

Inicialmente, nossa preocupação foi com o modelo experimental de colite a ser utilizado. O dextran sulfato de sódio (DSS) é um polissacarídeo polissulfatado sintético, conhecido como indutor químico de colite experimental (KIM et al., 2012). A vantagem de se utilizar este modelo é que ele promove inflamação intestinal mais homogênea (PERŠE; CERAR, 2012), facilitando a utilização do tecido em diversas análises. Como a resposta imunológica é similar à colite ulcerativa humana, seu uso é de extrema importância em estudos translacionais, pois pode direcionar o estudo de novas abordagem de tratamento (MELGAR et al., 2008; PERŠE; CERAR, 2012; RANDHAWA et al., 2014). Assim, decidimos utilizar o modelo de colite induzida por DSS para o estudo de probiótico pois foi o que mais se adequou aos objetivos proposto neste estudo. Entre os modelos animais utilizados para estudar a patogênese e a quimioprevenção da CRC, o modelo AOM / DSS tornou-se notável devido à alta reprodutibilidade, potência e simplicidade (NASUNO et al., 2014; REUNGWETWATTANA; DY, 2013; TANAKA et al., 2003).

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com *L. bulgaricus* retardou o aparecimento dos sinais clínicos de colite. Além disso, a doença manifestou-se com menor

gravidade quando comparados aos animais doentes e sem tratamento. Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos que relatam a capacidade de outros probióticos em melhorar a colite induzida por DSS, tanto nos parâmetros clínicos quanto na redução da gravidade da inflamação, incluindo *Lb. casei Shirota* (HERÍAS et al., 2005), *Lb. Casei* BL.23 (ROCHAT et al., 2007), *Lb. crispatus* M247 (CASTAGLIUOLO et al., 2005) e *E. coli* M-17 (FITZPATRICK et al., 2008), *L. plantarum*, *Bifidobacterium lactis* e *B. breve* (TOUMP; SOUFLP; EZZOUAR, 2014), *B. longum* CCM 7952 (SRUTKOVA et al., 2015).

A diminuição do comprimento do cólon inflamado é uma das principais características de CAC em camundongos tratados com AOM/DSS (LI et al., 2010). Tal característica é causada principalmente pelo endurecimento do tecido colônico, espessamento da mucosa e formação de neoplasia (MIZOGUCHI; KANNEGANTI; MINO-KENUDSON, 2011; PARK; CHANG; JEONG, 2014). Nossos achados mostraram que animais portadores de CAC e tratados com *L. bulgaricus* apresentaram cólons maiores, presumivelmente devido à redução do score de inflamação intestinal observada nos experimentos de colite que pode ter comprometido a iniciação da carcinogênese. Como resultado deste efeito, observamos menor desenvolvimento de tumores com redução expressiva do volume tumoral total e tamanho médio de tumores ao final do tratamento quando comparados aos animais doentes não tratados. Nossos resultados exibiram semelhanças entre os diversos trabalhos que evidenciam o potencial de probióticos na prevenção da carcinogênese provocada por AOM/DSS, tais como, *Streptococcus thermophilus* CRL807 e *L. delbrueckii* CRL864 (DEL CARMEN et al., 2017), VSL#3 (BASSAGANYA-RIERA et al., 2012; DO et al., 2016; CHUNG et al., 2017), *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella koreensis* (LEE et al., 2016). Em estudos humanos, o consumo de probióticos contendo *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* é causalmente relacionado à prevenção do desenvolvimento do câncer de cólon (GAO et al., 2015; HE et al., 2013; LIU et al., 2016). Essas observações são muito interessantes, pois podem tornar real esta estratégia para a prevenção primária do CRC.

Diferentes mecanismos de atuação do probiótico podem estar envolvidos no efeito benéfico observado (CHONG, 2014; DAI, 2013). No entanto, considerando as propriedades imunomoduladoras relatadas por probióticos, primeiramente investigamos os níveis de citocinas e células imunes encontrados na colite experimental. Nos animais doentes e tratados com *L. bulgaricus*, observamos redução das citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-12, IL-17 e IL-23 no tecido inflamado e diminuição da frequência de macrófagos e de linfócitos TCD8⁺ infiltrantes quando comparados aos animais doentes e não tratados. Ao investigar as

concentrações intestinais de citocinas produzidas em cólons e tumores de animais induzidos com AOM/DSS, verificamos uma acentuada diminuição na produção das citocinas IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-23 e aumento de IFN- γ em ambos os tecidos, quando comparados aos animais com câncer e não tratados.

Elevação dos níveis de citocinas como IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-17 e IL-23 está criticamente envolvido na patogênese de DII e CAC (GRIVENNIKOV, 2014). No que diz respeito à carcinogênese do cólon, macrófagos associados ao tumor (TAM) e o microambiente inflamatório podem afetar a regulação de genes importantes para sobrevivência, proliferação e morte celular (ERRENI; MANTOVANI; ALLAVENA, 2011; WALDNER; NEURATH, 2015b).

Estudo anterior mostra que IL-6 produzida por células mieloides da lâmina própria protege células epiteliais intestinais danificadas de sofrer apoptose durante a colite experimental e CAC (CHANG; DALY; BROMBERG, 2014; GRIVENNIKOV et al., 2009). Esta proteção é decorrente da ativação de genes importantes para proliferação celular, como ciclina D e PCNA, além de genes anti-apoptóticos como BCL-XL e BCL2 (ATREYA; NEURATH, 2005; FU, 2006; GRIVENNIKOV et al., 2009). Em pacientes portadores de colite ulcerativa, o aumento dos níveis de citocina IL-6 no plasma, está correlacionada ao pior prognóstico da doença (NEURATH, 2014; NOWACKI et al., 2015; ZUNDLER; NEURATH, 2016). Recentes estudos têm mostrado que o bloqueio da via de sinalização IL-6/STAT3 inibe significativamente a gravidade da inflamação intestinal (CHANG; DALY; BROMBERG, 2014; CHEN et al., 2015b; GRIVENNIKOV et al., 2009). Isto porque, de forma diferenciada, IL-6 pode modular até mesmo células epiteliais, neutrófilos, macrófagos e células T que não expressam seu receptor. Neste caso, essa trans-sinalização ocorre por meio da interação dessa citocina com formas solúveis de seu receptor (IL6R) (JURJUS et al., 2016).

Uma outra citocina de suma importância e que teve sua expressão elevada detectada em pacientes com DII há mais de 20 anos, é o TNF- α (MURCH et al., 1991). Estudo recente mostrou que a concentração elevada de TNF- α presente no soro sanguíneo de pacientes com DC se correlacionava com a gravidade da doença (OWCZAREK et al., 2012). Outros grupos mostraram níveis aumentados de TNF- α no soro e na lâmina própria intestinal de pacientes com CD e UC (MURCH et al., 1991; NEDA; OKAMOTO; SASAKI, 1992), bem como na submucosa intestinal de pacientes com CD (MURCH et al., 1993). A produção de TNF- α na mucosa do cólon de pacientes com UC foi atribuída aos macrófagos de lâmina própria (MURCH et al., 1993). A patogênese da DII está associada também à expressão alterada dos

receptores de TNF- α , uma vez que tanto os pacientes com CD quanto os pacientes com UC apresentaram elevada expressão de TNFR2 nas células epiteliais do cólon e forma solúvel no plasma (MIZOGUCHI et al., 2002; ŚLEBIODA; KMIEĆ, 2014).

A família do TNF contribui para a patogênese de DII de diversas maneiras. O TNF- α atua na integridade do epitélio intestinal alterando a disposição das proteínas de adesão nos enterócitos e a expressão de TNF- α , FasL, TRAIL e TWEAK induz a morte apoptótica destas células. Além disso, as proteínas TNF- α , TL1A, TWEAK e possivelmente FasL promovem a atividade pró-inflamatória de células mononucleares infiltrantes de mucosa e afetam a atividade de células T reguladoras e macrófagos regulatórios (ŚLEBIODA; KMIEĆ, 2014).

O uso de terapias α -TNF para DII vem sendo cada vez mais utilizado (STRIK et al., 2016). Há quatro α -TNF utilizados: infliximab (IFX), adalimumab (ADL), golimumab (GLM, apenas para colite ulcerativa (UC)) e certolizumab pegol (CZP) que só foi aprovado para doença de Crohn (CD) nos Estados Unidos e na Suíça (D.E., 2009; LICHTENSTEIN et al., 2005; REINISCH et al., 2011; RUTGEERTS et al., 2005; SANDBORN et al., 2014a, 2014b; WONG et al., 2009). Infelizmente, uma proporção considerável de pacientes não responde à estas terapias, o que geralmente leva à interrupção do tratamento (BEN-HORIN; CHOWERS, 2011).

Apesar do seu nome, já está bem estabelecido que TNF- α atua como promotor de proliferação, invasão e metástase de células tumorais (BALKWILL, 2006). As células epiteliais intestinais são altamente sensíveis ao TNF devido a altos níveis de expressão de TNFR1, que ativa as vias oncogênicas dependentes de NF- κ B (WEST et al., 2015). Desta forma, TNF- α pode induzir transição epitélio-mesenquimal e posteriormente promover a invasão e metástase tumoral (BALKWILL, 2006; WU; ZHOU, 2010; ZHENG et al., 2016). Popivanova e seu grupo demonstraram pela primeira vez que TNF- α é um mediador crucial da iniciação e progressão da carcinogênese do cólon associada à colite e sugeriram que a inativação do funcionamento de TNF- α poderia ser útil no tratamento do câncer de cólon em indivíduos com UC (POPIVANOVA et al., 2008). Camundongos deficientes para TNFR1 e submetidos ao protocolo AOM/DSS demonstraram redução do dano da mucosa, recrutamento de macrófagos e neutrófilos e menores tumores no cólon (POPIVANOVA et al., 2008).

A imunomodulação da expressão de proteínas da família do TNF vem sendo intensamente investigada através da manipulação da composição bacteriana do intestino utilizando bactérias probióticas. Em colite experimental, *L. rhamnosus* GG 1.2134 reduziu a expressão de TNF- α e NF κ B-p65 (GAMALLAT et al., 2016), tratamento com *Escherichia*

coli Nissle 1917 reduziu níveis de TNF- α (SHA et al., 2014), *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* reduziram a expressão de TNF- α através da inibição da expressão de TLR-4 (YANG et al., 2013), VSL#3 reduziu TNF- α por inibir a ativação da via PI3K/Akt e NF- κ B (DAI et al., 2013). Em trabalhos com câncer colorretal, temos que *Spegillus oryzae*, *Bacillus subtilis-SKm* e *Lactococcus lactis-GAm* diminui níveis de TNF- α e atenua o desenvolvimento tumoral (PARK; CHANG; JEONG, 2014), *Propionibacterium freudenreichii* atuou como um novo adjuvante para terapia baseada em TRAIL (COUSIN et al., 2016), a histamina gerada por *L. reuteri* suprimiu a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas, TNF- α , que promoveu efeito anti-tumoral (GAO et al., 2017).

Assim como TNF, a citocina IL-1 β também é capaz de alterar as junções celulares e comprometer a permeabilidade intestinal (AL-SADI; MA, 2007). Como a integridade da barreira epitelial é essencial para bloquear o acesso de microorganismos e toxinas aos tecidos subjacentes, a IL-1 β provavelmente pode representar um primeiro gatilho da inflamação intestinal sugerindo papel importante desta citocina na promoção da inflamação localizada (AL-SADI; MA, 2007; KI et al., 2005). Estudos com infecção mostraram que ao bloquear IL-1 β , há melhora na inflamação, tanto na colite associada a *Clostridium difficile* quanto na enterite induzida por *Salmonella typhimurium* (MÜLLER et al., 2009; NG et al., 2010). De fato, níveis elevados de IL-1 β , produzidos por monócitos da lâmina própria do cólon, são encontrados na mucosa de pacientes com DII (LIGUMSKY et al., 1990; NEMETZ et al., 1999), e esta secreção está correlacionada com a agressividade da doença e lesões recorrentes (CASINI-RAGGI et al., 1995; LUDWICZEK et al., 2004).

IL-1 também está envolvida no desenvolvimento de colite induzida por DSS em camundongos (ARAI et al., 1998). A redução de IL-1 β pode ser conseguida por diferentes caminhos. A incubação de tecidos de cólon provindos de pacientes com doença de Crohn mostrou que certas bactérias probióticas são capazes de interagir com células imunocompetentes e modular a produção local de citocinas pró-inflamatória (BORRUEL et al., 2002). Em modelo animal, *B. infantis* combinado ou não com oligofructose e Inulina (OFI) atenuaram a inflamação na colite induzida por DSS por diminuir IL-1 β (ARAI et al., 1998), *L. acidophilus*, *C. butyricum*, *B. adolescentis* e *E. faecalis* foram eficazes contra os danos induzido por DSS na colite experimental, principalmente por reduzir neutrófilo infiltrado e diminuir a expressão de IL-1 no tecido (CHEN et al., 2009). O extrato de *Rhodobacter sphaeroides* (Lycogen™), promoveu redução da inflamação colônica por

diminuir níveis de TNF- α e IL-1 β (LIU et al., 2012), *L. paracasei* preveniu sintomas clínicos de colite e diminuiu níveis de IL-1 β e TNF- α em BALB/c (PAN et al., 2014).

Pelo exposto, a diminuição concomitante dos níveis intestinais de IL-6, TNF- α e IL-1 β induzida por *L. bulgaricus* na colite e em CAC, nos quais estas citocinas atuam de forma a exacerbar a inflamação e favorecer a progressão tumoral, poderia limitar o processo de tumorigênese em estágios mais avançados da carcinogênese.

Tradicionalmente é reconhecido que DC está associada às citocinas Th1 e a CU é modulada pelas citocinas Th2. Este conceito foi recentemente persuadido pela descoberta de novas células do subconjunto Th17 (ELSON; CONG, 2012). Embora a controvérsia permaneça, as células Th17 são geralmente aceitas como mediadores da inflamação intestinal através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17 (HAAG; SIEGMUND, 2015). Portanto, células Th17 podem ser um alvo potencial para o tratamento de DII.

Demonstramos que a administração oral de *L. bulgaricus*, suprimiu a produção da citocina pró-inflamatória IL-17 em colite e em CAC. Estudos anteriores corroboram com nossos achados em que IL-17, uma citocina que caracteriza o padrão Th17, foi dramaticamente aumentada na inflamação intestinal e em câncer de colorectal (GRIVENNIKOV et al., 2012; HÖLTTÄ et al., 2013; HYUN et al., 2012; KATHANIA et al., 2016; MIYAUCHI et al., 2013; UENO et al., 2013).

Estudos mostraram que IL-23 atua nas células do sistema imune inato e contribui para a produção de citocinas inflamatórias e inflamação tecidual. Portanto, o papel do eixo IL-23/IL-17 na patogênese da inflamação intestinal crônica foi destacado tanto em estudos em animais quanto em humanos, sendo esta via relevante especialmente na patogênese da doença de Crohn (CƏTANƏ et al., 2015; SUN et al., 2015). Além disso, estudos recentes sugeriram que a IL-23 envolve a patogênese da UC ao aumentar a secreção de IL-17 (CƏTANƏ et al., 2015; LANGRISH et al., 2005; OUYANG; KOLLS; ZHENG, 2008). Estudos em animais e humanos confirmaram um papel crítico do eixo IL-23/IL-17 na patogênese da DII (FRANKE et al., 2008; GEREMIA; JEWELL, 2012; McLEAN, 2014).

Particularmente nos seres humanos, o desenvolvimento inicial das células Th17 é induzido pelo sinergismo TGF- β e IL-6, bem como a presença de baixos níveis de TGF- β e IL-1 β (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007). O segundo estágio é a expansão da população Th17 sob a ativação da IL-21. Este estágio é seguido pela fase de estabilização conduzida pela citocina pró-inflamatória IL-23 (GEREMIA; JEWELL, 2012; MUDTER et al., 2011). Desta maneira, a menor produção de IL-1 β e IL-6 observada nos camundongos

tratados com *L. bulgaricus* observados em nossos resultados, permite refletir que a diferenciação e manutenção das células Th17 foi limitada e, consequentemente, observamos menor produção de IL-17.

Embora não tenhamos tentado elucidar os mecanismos moleculares que medeiam o papel inibitório de *L. bulgaricus* na regulação de IL-23, suspeitamos que a expressão reduzida de TNF- α pode ser responsável. Na verdade, estudos anteriores mostraram claramente que o fator nuclear (NF- κ B), um mediador crítico da sinalização de TNF α , regula a transcrição do gene IL-23p19 (FIORUCCI et al., 2002). Uma descoberta recente pelo laboratório de Vrese mostrou que os probióticos *B. breve* e *L. rhamnosus* GG (LGG) inibem a expressão de IL-23 em células intestinais ativada por lipopolissacarídeo (LPS) através da inibição da acetilação de histonas e aumento da metilação do DNA (MIYAUCHI et al., 2013), fornecendo outro potencial mecanismo para a regulação negativa mediada por *L. bulgaricus* da IL-23.

Além disso, em nosso estudo a expressão de IL-23 foi significativamente reduzida nos grupos doentes e tratados com probiótico em contraste com o grupo apenas doente. O resultado implica que o probiótico melhora a colite experimental e CAC por estar envolvido na do eixo IL-23/IL-17. Trabalhos recentes corroboram com nossos resultados, pois a administração oral de *L. acidophilus* suprimiu a hiper-resposta associada à colite do eixo IL-23/Th17 (CHEN et al., 2015a) e o tratamento com *B. adolescentis* IM38 melhorou a colite provocada por obesidade e inibiu a diferenciação em células Th17 e reduziu os níveis de IL-17 no cólon de camundongos (LIM; KIM, 2017).

Uma importante família de proteínas com potencial atividade anti-tumoral é a dos interferons (IFNs). Eles estão envolvidos em muitas funções, incluindo respostas antivirais e antimicrobianas, regulação do ciclo celular e apoptose, indução de diferenciação celular e modulação de respostas imunes (GARCIA-DIAZ et al., 2017; GOUGH et al., 2008; HARADA; TANIGUCHI; TANAKA, 1998; PLATANIAS, 2005; RAKSHIT et al., 2014). Produzidos principalmente por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ ativados e células NK, IFN- γ é o único membro de IFN de tipo II e contribui para a vigilância e supressão do câncer (BILLIAU; HEREMANS, 1998; SAWAI et al., 1999). Em relação ao câncer colorretal, a deficiência de IFN- γ ou de seu receptor promove seu desenvolvimento (WANG et al., 2015). Estudos *in vitro*, demonstraram que IFN- γ pode sensibilizar as células do carcinoma do cólon primário humano para a apoptose mediada por Fas envolvendo expressão de Fas melhorada (LIU; ABRAMS, 2003; VON REYHER et al., 1998). Recentes estudos mostraram que o IFN- γ regula a expressão de genes relacionados à apoptose e trabalha com o TNF para sensibilizar

as células de carcinoma do cólon metastático para a apoptose mediada por TRAIL (LIU et al., 2011; TEKAUTZ et al., 2006).

Até aqui, concluímos que existem fortes evidências que apoiam que a modulação da resposta imune é um dos mais importantes mecanismos de ação dos probióticos contra colite e CAC. Em particular, muitos probióticos demonstraram regular processos inflamatórios, melhorar as funções de barreira intestinal e respostas imunes inatas.

Entretanto, há evidências de que a disbiose esteja associada a inflamação em DII e CAC, todavia, os mecanismos subjacentes à disbiose não estão bem compreendidos (KANG; MARTIN, 2017; TOMASELLO et al., 2014). Estudos clínicos demonstraram que as alterações na composição microbiana nos pacientes com DII geralmente envolvem redução da diversidade de bactéria, principalmente associada a um aumento de *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Veillonellaceae* e *Fusobacteriaceae* e diminuição de *Erysipelotrichales*, *Bacteroidales* e *Clostridiales* (HANSEN, 2015; KANG; MARTIN, 2017; SCHULTSZ et al., 1999; SWIDSINSKI et al., 2002).

Sabendo-se que certas espécies de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp e *Clostridium* spp. têm papel protetor em modelos de colite experimental (CHEN et al., 2015a; FUJIWARA et al., 2003; HERÍAS et al., 2005), fizemos uma quantificação de bactérias fecais pertencentes a esses gêneros ao final do experimento de colite. Apesar de não observarmos diferenças na quantificação dos gêneros isolados de bactérias, nossos resultados mostraram uma redução no número de bactérias anaeróbias totais do grupo doente e tratado com *L. bulgaricus*.

As bactérias anaeróbias têm sido envolvidas com a origem de DII e da mesma maneira, a participação das bactérias anaeróbias em colite experimental foi comprovada (AXELSSON et al., 1996). Estudo mostrou que os camundongos alimentados com antígenos de bactérias anaeróbicas tinham reduzido significativamente os *score* de colite após o DSS em comparação com os camundongos controle e que esse efeito foi perdido se as preparações de antígeno fossem co-administradas com toxina da cólera (VERDÛ et al., 2000). Outro estudo reconstituiu ratos tratados com antibiótico com bactérias entéricas cultivadas em condições anaeróbicas. Estes apresentaram colite mais agressiva do que aqueles associados às bactérias aeróbias, sugerindo que um subconjunto de bactérias luminal residentes induz colite, mas que uma interação complexa de bactérias comensais aeróbicas e anaeróbicas fornece o impulso antigênico constante para uma inflamação intestinal crônica (DIELEMAN; RATH; SCHULTZ, 2001).

Um mecanismo geral de ação dos probióticos é uma adesão ao epitélio intestinal, que não só ativam o sistema imune, mas também bloqueia a ligação de bactérias patogênicas ao epitélio e subsequente infecção (CHAIKHAM et al., 2012; CHONG, 2014; DHANANI; BAGCHI, 2013). No lúmen, ao se aderirem ao tecido, o probiótico favorece a exclusão de microbiota intestinal patogênica, tanto por competirem por nutrientes quanto por produzirem substâncias que afetam diretamente o crescimento de outras bactérias, incluindo certas formas de *Clostridium*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas* (CHAIKHAM et al., 2012; CHONG, 2014; DHANANI; BAGCHI, 2013; GIANOTTI et al., 2010; JOHANSSON et al., 1998; SOHN et al., 2010; TAREB et al., 2013; VERMA; SHUKLA, 2013). Ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta e peróxido de hidrogênio além de bacteriocinas são alguns fatores antimicrobianos que atuam diretamente matando ou inibindo o crescimento de bactérias patogênicas (CHICHLOWSKI; HALE, 2008; GILLOR; ETZION; RILEY, 2008; JONKERS et al., 2012; NEY et al., 2014; RILEY; WERTZ, 2002; SPINLER et al., 2008).

De maneira interessante, estudo recente demonstrou *in vitro*, que em condições anaeróbias o DSS incubado com conteúdo fecal é metabolizado sendo desulfatado e depois sofrendo degradação completa. No entanto, nenhum processo metabólico desse tipo ocorreu quando o conteúdo cecal de camundongos que receberam antibióticos foi utilizado. Estes resultados indicam que o passo inicial da colite ulcerativa induzida por DSS está relacionada ao seu metabolismo por bactérias anaeróbias (AKAO et al., 2015).

Mostramos que a administração oral de *L. bulgaricus* suprimiu o crescimento de bactérias anaeróbias na colite e impediu a sinalização da resposta inflamatória exacerbada associada à colite e CAC através do eixo IL-23 / Th17. Especificamente, o tratamento com *L. bulgaricus* inibiu a produção de citocinas pro-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-23 que são necessárias para a diferenciação e estabilização de células Th17. Por este motivo, observamos uma diminuição de IL-17. Prevê-se que os novos mecanismos anti-inflamatórios aqui destacados indicam que o papel terapêutico de *L. bulgaricus* no tratamento de doenças intestinais inflamatória e câncer colorretal envolve principalmente modulação do eixo imune IL-23 / IL-17. No entanto, mais estudos são pertinentes para desvendar novas vias de sinalização de *L. bulgaricus*.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- A administração dos *Lactobacillus bulgaricus* promoveu melhora dos sinais clínicos de inflamação na colite e CAC, além de reduzir a incidência e volume tumoral.
- A administração dos *Lactobacillus bulgaricus* regula a inflamação intestinal na colite por meio da redução de infiltrado de macrófagos e células TCD8⁺ no intestino.
- A administração dos *Lactobacillus bulgaricus* contribui para a melhora da colite experimental e CAC por meio do balanço entre as respostas Th1/Th17.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAO, T. et al. Metabolism of Dextran Sulfate Sodium by Intestinal Bacteria in Rat Cecum Is Related to Induction of Colitis. *v. 38, n. 4, p. 566–570, 2015.*
- AL-SADI, R. M.; MA, T. Y. IL-1 Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4641–4649, 2007.
- AMBALAM, P. et al. Probiotics, prebiotics and colorectal cancer prevention. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 30, n. 1, p. 119–131, 2016.
- ARAI, Y. et al. Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **Cytokine**, v. 10, n. 11, p. 890–6, 1998.
- ATREYA, R.; NEURATH, M. F. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 28, n. 3, p. 187–196, 2005.
- ATUMA, C. et al. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 280, n. 5, p. G922-9, 2001.
- AWANE, M. et al. NF-kappa B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF-alpha-, and IL-1 beta-induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. **Journal of immunology**, v. 162, n. 9, p. 5337–5344, 1999.
- AXELSSON, L. G. et al. Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK- cell depleted SCID mice. **Inflamm Res**, v. 45, n. 4, p. 181–191, 1996.
- BAI, A. P. et al. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 3, p. 284–288, 2006.
- BAIN, C. C. et al. Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. **Nature Immunology**, v. 15, n. 10, p. 929–937, 2014.
- BALKWILL, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, n. 3, p. 409–416, 2006.
- BASSAGANYA-RIERA, J. et al. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34676, 2012.
- BEKIARIS, V.; PERSSON, E. K.; AGACE, W. W. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. **Immunological Reviews**, v. 260, n. 1, p. 86–101, 2014.
- BELKAID, Y.; NAIK, S. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. **Nature Immunology**, v. 14, n. 7, p. 646–653, 2013.
- BEN-HORIN, S.; CHOWERS, Y. Review article: Loss of response to anti-TNF treatments in Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 9, p. 987–995, 2011.
- BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 345–350, 2007.
- BIEN, J.; PALAGANI, V.; BOZKO, P. The intestinal microbiota dysbiosis and *Clostridium difficile* infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 53–68, 2013.
- BILLIAU, A.; HEREMANS, H. Immunomodulatory Properties of Interferon- γ : An Update. **Annals of the New York ...**, 1998.
- BIRCHENOUGH, G. M. H. et al. New developments in goblet cell mucus secretion and function. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 4, p. 712–719, 2015.
- BORRUEL, N. et al. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. **Gut**, v. 51, n. 5, p. 659–64, 2002.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 521–533, 2003.
- BRON, P. A.; VAN BAARLEN, P.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 66–78, 2011.
- BROQUET, A. H. et al. RIG-I/MDA5/MAVS Are Required To Signal a Protective IFN Response in Rotavirus-Infected Intestinal Epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 3, p. 1618–1626, 2011.
- CANDIDO, J.; HAGEMANN, T. Cancer-related inflammation. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. SUPPL.1, 2013.
- CARTER, A. et al. Colonisation of poultry by Salmonella Enteritidis S1400 is reduced by combined administration of Lactobacillus salivarius 59 and Enterococcus faecium PXN-33. **Veterinary Microbiology**, v. 199, p. 100–107, 2017.
- CASINI-RAGGI, V. et al. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel

- disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 154, n. 5, p. 2434–2440, 1995.
- CASTAGLIUOLO, I. et al. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 197–204, 2005.
- CÖTANÖ, C. S. et al. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 19, p. 5823–5830, 2015.
- CHAIKHAM, P. et al. Influence of encapsulated probiotics combined with pressurized longan juice on colon microflora and their metabolic activities on the exposure to simulated dynamic gastrointestinal tract. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 133–142, 2012.
- CHANG, Q.; DALY, L.; BROMBERG, J. The IL-6 feed-forward loop: A driver of tumorigenesis. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 1, p. 48–53, 2014.
- CHASSAING, B.; LEY, R. E.; GEWIRTZ, A. T. Intestinal Epithelial cell Toll-like Receptor 5 Regulates the Intestinal Microbiota to Prevent Low-grade Inflammation and Metabolic Syndrome in Mice. **Gastroenterology**, v. 147, n. 6, p. 1363–1377, 2015.
- CHEN, L. et al. *Lactobacillus acidophilus* suppresses colitis-associated activation of the IL-23/Th17 axis. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015a.
- CHEN, L. L. et al. Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 3, p. 321–327, 2009.
- CHEN, Y. Y. et al. IL-6/STAT3/SOCS3 signaling pathway playing a regulatory role in ulcerative colitis carcinogenesis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 8, p. 12009–12017, 2015b.
- CHICHLAWSKI, M.; HALE, L. P. Bacterial-mucosal interactions in inflammatory bowel disease: an alliance gone bad. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 295, n. 6, p. G1139–G1149, 2008.
- CHONG, E. S. L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: Review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 351–374, 2014.
- CHUNG, E. J. et al. Combination of metformin and VSL#3 additively suppresses western-style diet induced colon cancer in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 794, n. June 2016, p. 1–7, 2017.
- CHUNG, Y. W. et al. *Lactobacillus casei* prevents the development of dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 mutant mice. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 151, n. 1, p. 182–189, 2008.
- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p. 629–636, 2007.
- COLLINS, M. D.; GIBSON, G. R. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. **Am. J. Clin. Nut.**, v. 69 (suppl), p. 1052S–7S., 1999.
- CONTE, M. P. et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 55, n. 12, p. 1760–1767, 2006.
- COUSIN, F. J. et al. The probiotic *Propionibacterium freudenreichii* as a new adjuvant for TRAIL-based therapy in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, p. 7161–7178, 2016.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. **Inflammation and cancer.pdf**Nature, 2002. Disponível em: <<http://www.jcimjournal.com/articles/publishArticles/pdf/2010111215352.pdf>>
- CROHN, B. B.; ROSENBERG, H. **the Sigmoidoscopic Picture of Chronic Ulcerative Colitis (Non-Specific)**The American Journal of the Medical Sciences, 1925. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000441-192508010-00006>>
- CUNNINGHAM-RUNDLES, S. et al. Probiotics and immune response. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. February, p. S22–S25, 2000.
- D.E., B. Certolizumab pegol for the treatment of Crohns disease. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 5, n. 6, p. 683–691, 2009.
- DAI, C. Probiotics and irritable bowel syndrome. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 36, p. 5973, 2013.
- DAI, C. et al. VSL#3 probiotics exerts the anti-inflammatory activity via PI3k/Akt and NF-κB pathway in rat model of DSS-induced colitis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 374, n. 1–2, p. 1–11, 2013.
- DASGUPTA, S. et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. **Cell Host and Microbe**, v. 15, n. 4, p. 413–423, 2014.
- DEL CARMEN, S. et al. Anti-cancer effect of lactic acid bacteria expressing antioxidant enzymes or IL-10 in a colorectal cancer mouse model. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 122–129, 2017.
- DELCENSERIE, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Curr Issues Mol Biol**, v. 10, n. 1–2, p. 37–54, 2008.
- DENNING, T. L. et al. Functional Specializations of Intestinal Dendritic Cell and Macrophage Subsets That Control Th17 and Regulatory T Cell Responses Are Dependent on the T Cell/APC Ratio, Source of Mouse

- Strain, and Regional Localization. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 2, p. 733–747, 2011.
- DHANANI, A. S.; BAGCHI, T. Lactobacillus plantarum CS24.2 prevents Escherichia coli adhesion to HT-29 cells and also down-regulates enteropathogen-induced tumor necrosis factor- α and interleukin-8 expression. **Microbiology and Immunology**, v. 57, n. 4, p. 309–315, 2013.
- DIELEMAN, L. A.; RATH, H. C.; SCHULTZ, M. Different Subsets of Enteric Bacteria Induce and Perpetuate Experimental Colitis in Rats and Mice. v. 69, n. 4, p. 2277–2285, 2001.
- DO, E. JU et al. Suppression of colitis-associated carcinogenesis through modulation of IL-6/STAT3 pathway by balsalazide and VSL#3. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 31, n. 8, p. 1453–1461, 2016.
- ECKBURG, P. B. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635–1638, 2005.
- ELSON, C. O.; CONG, Y. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. **Gut microbes**, v. 3, n. 4, p. 332–344, 2012.
- ERRENI, M.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer. **Cancer Microenvironment**, v. 4, n. 2, p. 141–154, 2011.
- FIORUCCI, S. et al. Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocyte reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis. **Digestion**, v. 66, n. 4, p. 246–256, 2002.
- FITZPATRICK, L. R. et al. In vitro and in vivo effects of the probiotic Escherichia coli strain M-17: immunomodulation and attenuation of murine colitis. **The British journal of nutrition**, v. 100, n. 3, p. 530–541, 2008.
- FRANKE, A. et al. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. **Nature Genetics**, v. 40, n. 6, p. 713–715, 2008.
- FU, X. Y. STAT3 in immune responses and inflammatory bowel diseases. **Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 214–219, 2006.
- FUJIWARA, M. et al. Inhibitory effects of Bifidobacterium longum on experimental ulcerative colitis induced in mice by synthetic dextran sulfate sodium. **Digestion**, v. 67, n. 1–2, p. 90–95, 2003.
- GAMALLAT, Y. et al. Lactobacillus rhamnosus induced epithelial cell apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 536–541, 2016.
- GAO, C. et al. TUMORIGENESIS AND NEOPLASTIC PROGRESSION Gut Microbe-Mediated Suppression of Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis by Luminal Histamine Production. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, 2017.
- GAO, Z. et al. Probiotics modify human intestinal mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 4, p. 6119–6127, 2015.
- GARCIA-DIAZ, A. et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. **Cell Reports**, v. 19, n. 6, p. 1189–1201, 2017.
- GEREMIA, A.; JEWELL, D. P. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 6, n. 2, p. 223–37, 2012.
- GIANOTTI, L. et al. A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 2, p. 167–175, 2010.
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 591–606, 2008.
- GIRARDIN, M.; SEIDMAN, E. G. Indications for the use of probiotics in gastrointestinal diseases. **Digestive Diseases**, v. 29, n. 6, p. 574–587, 2011.
- GOUGH, D. J. et al. IFN- γ signaling-Does it mean JAK-STAT? **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 19, n. 5–6, p. 383–394, 2008.
- GRIVENNIKOV, S. et al. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. **Cancer Cell**, v. 15, n. 2, p. 103–113, 2009.
- GRIVENNIKOV, S. I. et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. **Nature**, n. V, 2012.
- GRIVENNIKOV, S. I. NIH Public Access. v. 35, n. 2, p. 229–244, 2014.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.
- HAAG, L.-M.; SIEGMUND, B. Intestinal Microbiota and the Innate Immune System – A Crosstalk in Crohn's Disease Pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. September, p. 1–13, 2015.
- HADIS, U. et al. Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 237–246, 2011.
- HANSEN, J. J. Immune Responses to Intestinal Microbes in Inflammatory Bowel Diseases. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 15, n. 10, 2015.

- HARADA, H.; TANIGUCHI, T.; TANAKA, N. The role of interferon regulatory factors in the interferon system and cell growth control. **Biochimie**, v. 80, n. 8–9, p. 641–650, 1998.
- HARTNETT, L.; EGAN, L. J. Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 4, p. 723–731, 2012.
- HE, D. et al. Use of pro-/synbiotics as prophylaxis in patients undergoing colorectal resection for cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 37, n. 4, p. 406–415, 2013.
- HEALTH, H. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.
- HERÍAS, M. V. et al. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 143–155, 2005.
- HÖLTÄ, V. et al. Interleukin-17 Immunity in Pediatric Crohn Disease and Ulcerative Colitis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 287–292, 2013.
- HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268–1273, 2012.
- HUSSAIN, S. A. et al. Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) supplemented probiotic lassi prevents *Shigella* infiltration from epithelial barrier into systemic blood flow in mice model. **Microbial Pathogenesis**, v. 102, p. 143–147, 2017.
- HYUN, Y. S. et al. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 4, p. 931–936, 2012.
- IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.
- JÄGER, S.; STANGE, E. F.; WEHKAMP, J. Inflammatory bowel disease: An impaired barrier disease. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 398, n. 1, p. 1–12, 2013.
- JAIN, N.; WALKER, W. A. Diet and host–microbial crosstalk in postnatal intestinal immune homeostasis. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 1, p. 14–25, 2014.
- JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.
- JIANG, W. et al. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 11, p. 2465–2476, 2013.
- JOHANSSON, M. L. et al. Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 1–2, p. 29–38, 1998.
- JONKERS, D. et al. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. **Drugs**, v. 72, n. 6, p. 803–823, 2012.
- JURJUS, A. et al. Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. **BBA Clinical**, v. 5, p. 16–24, 2016.
- KAMADA, N. et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 321–335, 2013.
- KANG, M.; MARTIN, A. Microbiome and colorectal cancer: Unraveling host-microbiota interactions in colitis-associated colorectal cancer development. **Seminars in Immunology**, n. February, p. 0–1, 2017.
- KAPLAN, G. G.; NG, S. C. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 2, p. 313–321.e2, 2017.
- KARIN, M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 431–436, 2006.
- KATHANIA, M. et al. Itch inhibits IL-17-mediated colon inflammation and tumorigenesis by ROR- γ t ubiquitination. **Nature Immunology**, v. 17, n. 8, p. 997–1004, 2016.
- KI, H. K. et al. Interleukin-1 β targets interleukin-6 in progressing dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p. 647–654, 2005.
- KIM, J. J. et al. Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. **Journal of Visualized Experiments**, n. 60, p. 1–7, 2012.
- KNIGHTS, D.; LASSEN, K. G.; XAVIER, R. J. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome. **Gut**, v. 62, n. 10, p. 1505–1510, 2013.
- KUNISAWA, J. et al. Mode of Bioenergetic Metabolism during B Cell Differentiation in the Intestine Determines the Distinct Requirement for Vitamin B1. **Cell Reports**, v. 13, n. 1, p. 122–131, 2015.
- KUNISAWA, J.; KURASHIMA, Y.; KIYONO, H. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 6, p. 523–530, 2012.
- KURASHIMA, Y.; GOTO, Y.; KIYONO, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and

- intestinal inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 12, p. 3108–3115, 2013.
- LANGRISH, C. L. et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005.
- LARSSON, E. et al. Analysis of gut microbial regulation of host gene expression along the length of the gut and regulation of gut microbial ecology through MyD88. **Gut**, v. 61, n. 8, p. 1124–1131, 2012.
- LAVELLE, E. C. et al. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. **Mucosal Immunology**, v. 3, n. 1, p. 17–28, 2010.
- LEE, H. A. et al. Dietary Nanosized Lactobacillus plantarum Enhances the Anticancer Effect of Kimchi on Azoxymethane and Dextran Sulfate Sodium–Induced Colon Cancer in C57BL/6J Mice. **Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology**, v. 35, n. 2, p. 147–159, 2016.
- LEE, I. A. et al. Bifidobacterium longum HY8004 attenuates TNBS-induced colitis by inhibiting lipid peroxidation in mice. **Inflammation Research**, v. 59, n. 5, p. 359–368, 2010.
- LEE, J. H. et al. Lactobacillus suntoryeus inhibits pro-inflammatory cytokine expression and TLR-4-linked NF- κ B activation in experimental colitis. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 24, n. 2, p. 231–237, 2009.
- LEI, Y. M. K.; NAIR, L.; ALEGRE, M. L. The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, n. 1, p. 9–19, 2015.
- LI, H. et al. 2,3,4,5-Pentamethoxy-trans-stilbene, a resveratrol derivative, inhibits colitis-associated colorectal carcinogenesis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 6, p. 1352–1361, 2010.
- LICHTENSTEIN, G. R. et al. Infliximab maintenance treatment reduces hospitalizations, surgeries, and procedures in fistulizing Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 862–869, 2005.
- LIGUMSKY, M. et al. Role of interleukin 1 in inflammatory bowel disease -- enhanced production during active disease. **Gut**, v. 31(6), p. 686–689, 1990.
- LIM, S. M.; KIM, D. H. Bifidobacterium adolescentis IM38 ameliorates high-fat diet–induced colitis in mice by inhibiting NF- κ B activation and lipopolysaccharide production by gut microbiota. **Nutrition Research**, v. 41, p. 86–96, 2017.
- LIU, D. et al. Effects of Probiotics on Intestinal Mucosa Barrier in Patients With Colorectal Cancer after Operation. **Medicine**, v. 95, n. 15, p. e3342, 2016.
- LIU, F. et al. TNF α Cooperates with IFN- γ to Repress Bcl-xL Expression to Sensitize Metastatic Colon Carcinoma Cells to TRAIL-mediated Apoptosis. v. 6, n. 1, 2011.
- LIU, K.; ABRAMS, S. I. Coordinate Regulation of IFN Consensus Sequence-Binding Protein and Caspase-1 in the Sensitization of Human Colon Carcinoma Cells to Fas-Mediated Apoptosis by IFN- γ . **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 12, p. 6329–6337, 2003.
- LIU, W. S. et al. Amelioration of dextran sodium sulfate-induced colitis in mice by rhodobacter sphaeroides extract. **Molecules**, v. 17, n. 11, p. 13622–13630, 2012.
- LODDO, I.; ROMANO, C. Inflammatory bowel disease: Genetics, epigenetics, and pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. NOV, p. 6–11, 2015.
- LUDWICZEK, O. et al. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: Relationship to severity of inflammatory bowel disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 2, p. 323–329, 2004.
- LUI, J. B. et al. Cross-differentiation from the CD8 lineage to CD4T cells in the gut-associated microenvironment with a nonessential role of microbiota. **Cell Reports**, v. 10, n. 4, p. 574–585, 2015.
- MABBOTT, N. A. et al. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal Immunology**, v. 6, n. 4, p. 666–677, 2013.
- MACK, D. R. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of. p. 827–834, 2003.
- MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298–306, 2011.
- MANN, E. R.; LI, X. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 29, p. 9653–9664, 2014.
- MANTOVANI A., B. F. **Inflammation and cancer: back to Lancet**, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11229684>>
- MANUSCRIPT, A. Development of Experimental Colitis. v. 5, n. 9, p. 1–6, 2014.
- MARCHIANDO, A. M. et al. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. **Journal of Cell Biology**, v. 189, n. 1, p. 111–126, 2010.
- MARCHIANDO, A. M. et al. NIH Public Access. v. 140, n. 4, p. 1208–1218, 2012.
- MARCHIANDO, A. M. et al. A deficiency in the autophagy gene Atg16L1 enhances resistance to enteric bacterial infection. **Cell Host and Microbe**, v. 14, n. 2, p. 216–224, 2013.
- MARCHIANDO, A. M.; GRAHAM, W. V.; TURNER, J. R. Epithelial Barriers in Homeostasis and Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 5, n. 1, p. 119–144, 2010.
- MAYNARD, C. L. et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3–

- precursor cells in the absence of interleukin 10. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 931–941, 2007.
- MELGAR, S. et al. Validation of murine dextran sulfate sodium-induced colitis using four therapeutic agents for human inflammatory bowel disease. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 6, p. 836–844, 2008.
- MELILLO, J. A. et al. Dendritic Cell (DC)-Specific Targeting Reveals Stat3 as a Negative Regulator of DC Function. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 5, p. 2638–2645, 2010.
- MENNIGEN K.; RIJCKEN, E.; UTECH, M.; LOEFFLER, B.; SENNINGER, N.; BRUEWER, M., R. . N. Probiotic Mixture VSL #3 Protects the Epithelial Barrier by Maintaining Tight Junction Protein Expression and Preventing Apoptosis in a Murine Model of Colitis. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, p. G1140–G1149, 2009.
- MIKOV, M. M.; STOJANČEVIĆ, M. P.; BOJIĆ, G. M. Probiotics as a Promising Treatment for Inflammatory Bowel Disease. v. 9492, n. 1, p. 52–60, 2014.
- MIYAUCHI, E. et al. Bifidobacterium longum alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: Involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–11, 2013.
- MIZOGUCHI, E. et al. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 134–144, 2002.
- MIZOGUCHI, E.; KANNEGANTI, M.; MINO-KENUDSON, M. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. January, 2011.
- MOENS, E.; VELDHOFEN, M. Epithelial barrier biology: Good fences make good neighbours. **Immunology**, v. 135, n. 1, p. 1–8, 2012.
- MUDTER, J. et al. IRF4 regulates IL-17A promoter activity and controls ROR γ t-dependent Th17 colitis in vivo. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 6, p. 1343–1358, 2011.
- MÜLLER, A. J. et al. The S. Typhimurium Effector SopE Induces Caspase-1 Activation in Stromal Cells to Initiate Gut Inflammation. **Cell Host and Microbe**, v. 6, n. 2, p. 125–136, 2009.
- MUÑOZ, M. et al. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii* –induced immunopathology in the gut via matrix metalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 3047–3059, 2009.
- MURAI, M. et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nature Immunology**, v. 10, n. 11, p. 1178–1184, 2009.
- MURCH, S. H. et al. Serum concentrations of tumour necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 32, n. 8, p. 913–7, 1991.
- MURCH, S. H. et al. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 34, p. 1705–1709, 1993.
- MUSA, H. H. et al. The potential benefits of probiotics in animal production and health. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 2, p. 313–321, 2009.
- NASUNO, M. et al. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. **Stem Cells**, v. 32, n. 4, p. 913–925, 2014.
- NEDA, H.; OKAMOTO, T.; SASAKI, H. S E R U M T U M O R N E C R O S I S F A C T O R A C T I V I T Y I N. v. 4, 1992.
- NEMETZ, A. et al. IL1B gene polymorphisms influence the course and severity of inflammatory bowel disease. **Immunogenetics**, v. 49, n. 6, p. 527–531, 1999.
- NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 329–342, 2014.
- NEY, D. M. et al. American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology Deputy Editor : Associate Editors : p. 108, 2014.
- NG, E. W.; YEUNG, M.; TONG, P. S. Effects of yogurt starter cultures on the survival of Lactobacillus acidophilus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 169–175, 2011.
- NG, J. et al. Clostridium difficile toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 542–552.e3, 2010.
- NJDF, J. O. et al. Dbsdjophoftjt Bttdjbufe Xjui Dispojd Dpmjujt. v. 118, n. 2, 2008.
- NOVA, E. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. **The British journal of nutrition**, v. 98 Suppl 1, n. 2007, p. S90-5, 2007.
- NOWACKI, T. M. et al. The Risk of Colorectal Cancer in Patients with Ulcerative Colitis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, n. 2, p. 492–501, 2015.
- OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57–62, 2010.
- OF, T. H. E. V. the Value of Pathological. **Medical Education**, [s.d.].
- OHLAND, C. L.; MACNAUGHTON, W. K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 298, n. 167, p. G807-819, 2010.
- OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in

- Inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454–467, 2008.
- OWCZAREK, D. et al. TNF- α and soluble forms of TNF receptors 1 and 2 in the serum of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 122, n. 12, p. 616–23, 2012.
- PALMER, C. et al. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 7, p. 1556–1573, 2007.
- PAN, T. et al. Oral administration of *Lactobacillus paracasei* alleviates clinical symptoms of colitis induced by dextran sulphate sodium salt in BALB/c mice. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 3, p. 315–322, 2014.
- PARK, K.-Y.; CHANG, H.-K.; JEONG, J.-K. Doenjang prepared with mixed starter cultures attenuates azoxymethane and dextran sulfate sodium-induced colitis-associated colon carcinogenesis in mice. **Journal of Carcinogenesis**, v. 13, n. 1, p. 9, 2014.
- PERAN, L. et al. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 1, p. 96, 2007.
- PERŠE, M.; CERAR, A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- PLATANIAS, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 375–386, 2005.
- QUIGLEY, E. M. M. Gut bacteria in health and disease. **Gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 9, p. 560–9, 2013.
- RAKSHIT, S. et al. Interferon-gamma induced cell death: Regulation and contributions of nitric oxide, cJun N-terminal kinase, reactive oxygen species and peroxynitrite. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2645–2661, 2014.
- RAMANAN, D. et al. Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal bacteroides vulgatus. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 311–324, 2014.
- RANDHAWA, P. K. et al. A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 279–288, 2014.
- REINISCH, W. et al. Adalimumab for induction of clinical remission in moderately to severely active ulcerative colitis: results of a randomised controlled trial. **Gut**, v. 60, n. 6, p. 780–787, 2011.
- REUNGWETWATTANA, T.; DY, G. Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer. **Journal of Carcinogenesis**, v. 12, n. 22, p. 1–20, 2013.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 117–137, 2002.
- ROBERTSON, S. J. et al. Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. **Gut microbes**, v. 4, n. 3, p. 222–231, 2013.
- ROCHAT, T. et al. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 22, 2007.
- RUTGEERTS, P. et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **The New England journal of medicine**, v. 353, p. 2462–76, 2005.
- SANDBORN, W. J. et al. Subcutaneous golimumab induces clinical response and remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 146, n. 1, p. 85–95, 2014a.
- SANDBORN, W. J. et al. Subcutaneous golimumab maintains clinical response in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 146, n. 1, p. 96–109.e1, 2014b.
- SARTOR, R. B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577–594, 2008.
- SATHALIYAWALA, T. et al. Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 187–197, 2013.
- SAWAI, N. et al. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. **Infect. Immun**, v. 67, n. 1, p. 279–285, 1999.
- SCHACHTSIEK, M.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001 T Surface Protein Cpf Mediating Coaggregation with and Aggregation among Pathogens Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001 T Surface Protein Cpf Mediating Coaggregation with and Agg. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7078–7085, 2004.
- SCHARL, M.; ROGLER, G. Inflammatory bowel disease pathogenesis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 28, n. 4, p. 301–309, 2012.
- SCHULENBURG, H.; KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. Evolution of the innate immune system: The worm perspective. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 36–58, 2004.
- SCHULTSZ, C. et al. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. **Gastroenterology**, v. 117, n. 5, p. 1089–1097, 1999.
- SHA, S. et al. Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 with different courses and different doses on intestinal inflammation in murine model of colitis. **Inflammation Research**, v. 63, n. 10, p. 873–883, 2014.

- SHAW, M. H. et al. Microbiota-induced IL-1 β , but not IL-6, is critical for the development of steady-state T_H 17 cells in the intestine. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 2, p. 251–258, 2012.
- SHETH, P. et al. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, n. 1, p. G308–G318, 2007.
- SHI, N. et al. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. **Military Medical Research**, v. 4, n. 1, p. 14, 2017.
- SHOUVAL, D. S. et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 706–719, 2014.
- SIKORSKA, H.; SMORAGIEWICZ, W. Role of probiotics in the prevention and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 6, p. 475–481, 2013.
- ŚLEBIODA, T. J.; KMIEĆ, Z. Tumour necrosis factor superfamily members in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.
- SMELT, M. J. et al. The Impact of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Teichoic Acid D-Alanylation on the Generation of Effector and Regulatory T-cells in Healthy Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–14, 2013.
- SOHN, M. et al. Correction for Choi et al., Cell-permeable Foxp3 protein alleviates autoimmune disease associated with inflammatory bowel disease and allergic airway inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 50, p. 21943–21943, 2010.
- SOKOL, H. et al. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 2, p. 106–111, 2006.
- SPINLER, J. K. et al. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe**, v. 14, n. 3, p. 166–171, 2008.
- SRUTKOVA, D. et al. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 promotes epithelial barrier function and prevents acute dss-induced colitis in strictly strain-Specific manner. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.
- STRIK, A. S. et al. Optimization of anti-TNF therapy in patients with Inflammatory Bowel Disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 2433, n. July, p. 1–11, 2016.
- STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. Science in medicine The fundamental basis of inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 514–21, 2007.
- SUN, Y. et al. Ginkgo biloba extract (Ginaton) ameliorates dextran sulfate sodium (DSS)-induced acute experimental colitis in mice via reducing IL-6/STAT3 and IL-23/IL-17. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 17235–17247, 2015.
- SWIDSINSKI, A. et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 44–54, 2002.
- TAKAISHI, H. et al. Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, n. 5–6, p. 463–472, 2008.
- TAKEDA, K. et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of stat3 in macrophages and neutrophils. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 39–49, 1999.
- TANAKA, T. et al. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. **Cancer Science**, v. 94, n. 11, p. 965–973, 2003.
- TAREB, R. et al. In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART4, p. 637–649, 2013.
- TEKAUTZ, T. M. et al. Evaluation of IFN- γ effects on apoptosis and gene expression in neuroblastoma-Preclinical studies. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 10, p. 1000–1010, 2006.
- THOMAS, D. W.; GREER, F. R. Clinical Report — Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. v. 126, n. 6, 2017.
- TOMASELLO, G. et al. Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 18121–18130, 2014.
- TOUMP, R.; SOUFLP, I.; EZZOUAR, B. Sodium-Induced Experimental Colitis in Mice. v. 27, n. 4, p. 615–627, 2014.
- TROY, E. B.; KASPER, D. L. Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 15, n. 8, p. 25–34, 2010.
- UEDA, Y. et al. Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. **International Immunology**, v. 22, n. 12, p. 953–962, 2010.
- UEMATSU, S.; FUJIMOTO, K. The innate immune system in the intestine. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 11, p. 645–657, 2010.
- UENO, A. et al. Increased Prevalence of Circulating Novel IL-17 Secreting Foxp3 Expressing CD4+ T Cells and Defective Suppressive Function of Circulating Foxp3+ Regulatory Cells Support Plasticity Between Th17 and

- Regulatory T Cells in Inflammatory Bowel Disease Patients. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, n. 12, p. 2522–2534, 2013.
- VEENBERGEN, S.; SAMSOM, J. N. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets. **Current Opinion in Immunology**, v. 24, n. 3, p. 269–276, 2012.
- VERDÜ, E. F. et al. Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice. **Clinical and experimental immunology**, v. 120, n. 1, p. 46–50, 2000.
- VERMA, A.; SHUKLA, G. Probiotics Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus acidophilus suppresses DMH-induced procarcinogenic fecal enzymes and preneoplastic aberrant crypt foci in early colon carcinogenesis in sprague dawley rats. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n. 1, p. 84–91, 2013.
- VIENNOIS, E. et al. Dextran sodium sulfate inhibits the activities of both polymerase and reverse transcriptase: lithium chloride purification, a rapid and efficient technique to purify RNA. **BMC research notes**, v. 6, p. 360, 2013.
- VIGGIANO, D. et al. Gut barrier in health and disease: focus on childhood. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 1077–1085, 2015.
- VON REYHER, U. et al. Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. **Cancer Res**, v. 58, p. 526–534, 1998.
- WAGNER, N. et al. L-selectin and beta7 integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. **European journal of immunology**, v. 28, n. 11, p. 3832–3839, 1998.
- WALDNER, M. J.; NEURATH, M. F. **Mechanisms of Immune Signaling in Colitis-Associated Cancer** Cmgh, 2015a.
- WALDNER, M. J.; NEURATH, M. F. Mechanisms of Immune Signaling in Colitis-Associated Cancer. **Cmgh**, v. 1, n. 1, p. 6–16, 2015b.
- WALKER, A. W. et al. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 7, 2011.
- WANG, L. et al. Deficiency of Interferon-Gamma or Its Receptor Promotes Colorectal Cancer Development. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 4, p. 273–280, 2015.
- WEBER, B.; SAURER, L.; MUELLER, C. Intestinal macrophages: Differentiation and involvement in intestinal immunopathologies. **Seminars in Immunopathology**, v. 31, n. 2, p. 171–184, 2009.
- WEST, N. R. et al. Emerging cytokine networks in colorectal cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 615–629, 2015.
- WINTER, T. et al. $\alpha\text{CTM} p < O$, OSvsplacel ~. p. 1581, [s.d.].
- WONG, M. et al. directions. v. 126, n. 2, p. 121–136, 2009.
- WU, Y.; ZHOU, B. P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 4, p. 639–644, 2010.
- YANG, X. et al. Impact of Probiotics on Toll-like Receptor 4 Expression in an Experimental Model of Ulcerative Colitis *. v. 33, n. 2012, p. 661–665, 2013.
- ZHENG, H. et al. Establishing the colitis-associated cancer progression mouse models. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 759–763, 2016.
- ZIGMOND, E. et al. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 720–733, 2014.
- ZUNDLER, S.; NEURATH, M. Integrating Immunologic Signaling Networks: The JAK/STAT Pathway in Colitis and Colitis-Associated Cancer. **Vaccines**, v. 4, n. 1, p. 5, 2016.
- KAPLAN GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. **Nat Rev GastroenterolHepatol**. 2015;12(12):720-727.
- WILKS, S; MOXON. W. Lectures on pathological anatomy. Second ed. London: J & A Churchill; 1875.
- MULDER DJ, NOBLE AJ, JUSTINICH CJ, DUFFIN JM. A tale of two diseases: the history of inflammatory bowel disease. **J Crohns Colitis**;8(5):341-348, 2014.
- CRAFTS N. Productivity growth in the industrial revolution: A new growth accountingperspective. **The Journal of Economic History**. 64(02):521-535, 2004;.
- BURISCH J, JESS T, MARTINATO M, LAKATOS PL. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. **Journal of Crohn's and Colitis**.;7(4):322-337, 2013.
- WATERS CN, ZALASIEWICZ J, SUMMERHAYES C, et al. The Anthropocene is functionally and stratigraphically distinct from the Holocene. **Science**. 8;351(6269):aad2622. 2016
- MOLODECKY NA, PANACCIONE R, GHOSH S, BARKEMA HW, KAPLAN GG. Challenges associated with identifying the environmental determinants of the inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**;17(8):1792-1798, 2011.
- ZWI AB, MILLS A. Health policy in less developed countries: past trends and future directions. **J Int Dev**.;7(3):299-328, 1995.

- XAVIER RJ, PODOLSKY DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**; 448: 427-434, 2007.
- ABRAHAM C, CHO JH. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**; 361: 2066-2078, 2009.
- DANESE S, FIOCCHI C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**; 12: 4807-4812, 2006.
- JOSTINS L, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**; 491: 119-124, 2012.
- JOSTINS L, RIPKE S, WEERSMA RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**;491(7422):119-124. 46, 2012.
- KHOR B, GARDET A, XAVIER RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, 474(7351):307-317, 2011.
- LIU JZ, van SOMMEREN S, HUANG H, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. **Nat Genet**;47(9):979-986, 2015.
- RIOUX JD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. **Nat Genet**; 39: 596-604, 2007.
- HAMPE J, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. **Nat Genet**; 39: 207-211, 2007.
- MCCARROLL AS. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. **Nat Genet** 2008.
- ANDERSON CA, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. **Nat Genet**; 43: 246-252, 2011.
- BRAND S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. **Gut**; 58: 1152-1167, 2009.
- TRAVASSOS LH, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. **Nat Immunol**; 11: 55-62, 2010.
- KUBALLA P, HUETT A, RIOUX JD, DALY MJ, XAVIER RJ. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. **PLoS One** 3: e3391, 2008.
- VENTHAM NT, KENNEDY NA, NIMMO ER, SATSANGI J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. **Gastroenterology**. 145(2):293-308, 2013.
- LOFTUS EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**; 126: 1504-1517, 2004.
- SUEZ J, KOREM T, ZEEVI D, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. **Nature**. Oct 9;514(7521):181-186. 78, 2014.
- CHASSAING B, KOREN O, GOODRICH JK, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**. Mar 5;519(7541):92-96. 79. 2015.
- BURISCH J, PEDERSEN N, CUKOVIC-CAVKA S, et al. Environmental factors in a populationbased inception cohort of inflammatory bowel disease patients in Europe--an ECCOEpiCom study. **J Crohns Colitis**;8(7):607-616. 80, 2014.
- SAKAMATO N, KONO S, WAKAI K, et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. **Inflamm Bowel Dis**. 11(2):154-163,2005;.
- MAUNDER RG. Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: evaluation, synthesis, and future directions. **Inflamm Bowel Dis**; 11: 600-608, 2005.
- MAWDSLEY JE, RAMPTON DS. Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. **Gut**; 54: 1481, 2005.
- MAWDSLEY JE, RAMPTON DS. The role of psychological stress in inflammatory bowel disease. **Neuroimmunomodulation**; 13: 327-336, 2006.
- CÁMARA RJ, SCHOEPFER AM, PITTET V, BEGRÉ S, VON KÄNEL R. Mood and nonmood components of perceived stress and exacerbation of Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis** 17: 2358-2365,2011.
- GOODHAND JR, GREIG FI, KOODUN Y, et al. Do antidepressants influence the disease course in inflammatory bowel disease? A retrospective case-matched observational study. **Inflamm Bowel Dis**. 18: 1232-1239, 2012.
- BURISCH J, JESS T, MARTINATO M, LAKATOS PL. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. **Journal of Crohn's and Colitis**;7(4):322-337, 2013

Title Page

Journal: *BioMed Research International*

Title: *Lactobacillus bulgaricus* inhibits colitis-associated cancer via a negatively regulation of intestinal inflammation

Authors:

Denise Sayuri Calheiros da Silveira (BS, MSc, PhD candidate)^a; E-mail: denise_sayuri@usp.br

Luciana Chain Veronez (BS, MSc, PhD)^a; E-mail: lcveronez@usp.br

Elen Anatriello (BS, MSc, PhD)^b; E-mail: elenanatriello@gmail.com

Luis Carlos Lopes-Júnior (RN, MSc, PhD)^c; E-mail: lopesjr.lc@gmail.com

Jéssica Cristina dos Santos (BS, MSc, PhD candidate)^a; E-mail: jessicasantos@usp.br

Gabriela Pereira-da-Silva (BS, MSc, PhD in Immunology)^{a,b*}; E-mail: gbisson@eerp.usp.br

Author Affiliations:

^a Graduate Program in Basic and Applied Immunology of the University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^b Institute of Science and Technology at Federal University of São Paulo – UNIFESP. São José dos Campos, SP, Brazil.

^c University of São Paulo at Ribeirão Preto College of Nursing, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

***Corresponding author:** Dr. Gabriela Pereira-da-Silva

Department of Maternal-Infant Nursing and Public Health, University of São Paulo at Ribeirão Preto College of Nursing - WHO Collaborating Centre for Nursing Research Development. Av. Bandeirantes, 3900. 14040-902, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Phone: +55-16-36020538, Fax: +55-16-36020518. E-mail: gbisson@eerp.usp.br

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

Abbreviations:

CRC, colorectal cancer; CA-CRC, colitis-associated cancer; AOM, Azoxymethane; DSS, Dextran sulfate sodium; IBD, inflammatory bowel disease; IFN-, interferon; IL-, interleukin-; PBS, phosphate-buffered saline; TGF-, transforming growth factor; TNF-, tumor necrosis factor; UC, ulcerative colitis.

ABSTRACT

Colitis-associated cancer (CAC) accounts for 2-3% of colorectal cancer CRC cases preceded by inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis. Patients with IBD have a higher risk for developing CRC and are affected by the disease earlier than patients with sporadic CRC. Intestinal microbiota has been reported to play a central role in the pathogenesis of IBD and CAC. There is a clear increase in interest in investigating ways to circumvent changes in the host's immune response to microbial dysbiosis using supplements based on live microorganisms. Recently, numerous prebiotics and probiotics are being investigated as antitumor agents due to their capacity to modulate inflammatory responses. Although previous studies have indicated that LAB could be successfully used in managing sporadic CRC, little is known about their role in CAC. So, in this study, we sought to investigate the effects of the probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in colitis-associated carcinogenesis. *L. bulgaricus* negatively regulated tumor progression, resulting in an expressive reduction of total tumor volume and mean size of tumors. In addition, the probiotic also attenuated the clinical signs of intestinal inflammation possibly inducing a decrease in the levels of intestinal IL-6, TNF- α , IL-17, IL-23 and IL-1 β . Taken together, our results evidence an anti-inflammatory role and consequent antitumor effect of *L. bulgaricus* on colitis-associated cancer.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) remains one of the most incident type of cancer worldwide, being the third and second most frequently cancer diagnosed in men and women, respectively [1, 2]. Colitis-associated cancer (CAC), specifically, accounts for 2-3% of CRC cases preceded by inflammatory bowel diseases (IBD) such as Crohn's disease and ulcerative colitis [3, 4]. The connection between inflammation and cancer was firstly recognised by Rudolf Virchow in 1863 and recently has been exemplified by CAC. Patients with IBD have a higher risk for developing CRC [5] and are affected by the disease earlier than patients with sporadic CRC [6].

Currently, it has become increasingly evidente that intestinal microbiota plays a crucial role in the pathogenesis of IBD and CRC. Changes in intestinal microbiota have been reported in colon cancer patients supporting this idea [7, 8]. Among these gut microorganisms, probiotic bacteria may be defined as live microbial food supplements that confer benefits to the health of the consumer (WHO), including reduction of pathogen colonization by competition [9], improvement in vitamin synthesis, stimulation of epithelial cell proliferation and differentiation, fortification of intestinal barrier and optimization of intestinal transit [10, 11].

In addition to the direct benefit of probiotics on the improvement of the host gut microbiota, probiotics have received considerable attention due to their anti-carcinogenic activities, specially in colorectal cancer [12, 13, 14]. The underlying mechanisms for their anti-tumor effects are versatile and include: modulation of host immune responses, such as proliferation of regulatory T cells, activation of macrophages and dendritic cells, and production of immunoglobulins and cytokines [15]; alteration of intestinal microbiota metabolism [13, 16]; regulation of cell death, apoptosis, cell cycle, proliferation, invasion and metastasis [17, 18, 19, 20]; competition with pathogenic bacteria [21, 22]; and inactivation of cancerogenic compounds [23, 24].

The most common microorganisms used as probiotics comprises a group of bacteria named lactic acid bacteria (LAB) that produces lactic acid as the primary metabolite of sugar metabolism, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [25, 26]. Although previous studies have indicated that LAB could be successfully used in managing food allergies, diarrhea, IBDs and sporadic CRC [27, 28, 29, 30, 31, 32], little is know about its role in CAC. In this study, we sought to investigate the effects of the probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in colitis-associated carcinogenesis.

MATERIAL AND METHODS

Mice and treatment protocol

In the present study, we used male C57BL/6 wild type mice (wild type - WT), between 4-6 weeks of age and weighing between 20-25g. The animals were housed and kept at the Animal Facility of the University of São Paulo at Ribeirão Preto College of Nursing – EERP/USP (Ribeirão Preto, SP, Brazil) under controlled temperature conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), 12/12 photoperiod hours and water and food *ad libitum*.

Lactobacillus bulgaricus and treatment

Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus, lot number FK0201, identification LB-G040, Chinese origin, was purchased from Liane Drugstore, Ribeirão Preto, SP, Brazil and kept in a closed container at 4°C . For mice treatment, 10^9 CFU were diluted in 200ul of PBS and given to each mice, 3 times a week during all experimental period. Prior to tumor induction, mice were randomly distributed in 2 groups (n=10) and treated with PBS (control) or *L. bulgaricus* by gavage (0.2 ml/mouse) for one week.

CAC induction

For CAC induction, mice were injected i.p. with a single dose (10 mg/kg in 300 μl solution) of azoxymethane (AOM - Sigma-Aldrich), followed by 3 cycles of one week of 2.5% Dextran sulfate sodium (DSS) diluted in drinking water intercalated for 2 weeks of normal water [33, 34, 35]. Mice were euthanized between the 9th and 12th weeks after induction of CAC (Figure 1A).

Disease score evaluation

Intestinal inflammation *in vivo*, or disease score, was determined by scoring clinical signs as previously described [36]. Briefly, we used a scoring system in which one point (1.0) was attributed to each signal presented by the mouse: weight loss $\geq 5\%$ and $<10\%$ of body weight compared to the previous day; presence of humid perianal region; presence of diarrhea; blood in the stool or perianal region; hyporactivity and piloerection. When weight loss was $\geq 10\%$ 2 points were attributed to the "weight loss" signal. Finally, the final sum of these points determined the clinical score of the disease.

Determination of colon length

The severity of intestinal inflammation was also assessed by measuring the length of the entire large intestine. After euthanasia, colons were collected, carefully placed on a clean surface and photographed using a photographic camera. The images were calibrated by the

presence of a graduated ruler that served as a scale for the analyzes. Subsequently, images of the large intestine were evaluated using ImageJ software.

Determination of tumor volume and multiplicity

After euthanasia, the colons were longitudinally opened, washed and examined with regards to presence of tumors. The multiplicity of tumors were verified for each animal in the experimental groups. The dimensions of the colorectal tumors were measured with pachymeter and the volumes were calculated by formula: $(\text{width})^2 \times \text{length} / 2$ [37]. Total tumor volume, indicates the sum of the volumes of all tumors found in each colon. Mean tumor volume refers to the mean tumor size, i.e., total tumor volume divided by the number of tumors of each colon.

Cytokine quantification

Cytokines levels were determined from colon and/or tumor samples. Tissues were collected, weighed and immediately homogenized in PBS in the presence of protease inhibitors (Roche) using a tissue homogenizer (Polytron System PT 1200E). The material was then centrifuged at 6000 rpm for 15 min at 4 ° C and the supernatant collected, aliquoted and stored at -80 ° C until the time of use. The concentrations of TNF α , IL-6, IL-12 (p70), IL-17, IFN- γ , IL-1 α , IL-10, TGF- β , IL-23 were determined by ELISA BD OptEIA™ kits (BD Biosciences Pharmingen) or DuoSet (R & D Systems). The protocol was performed according to the manufacturers' instructions. Cytokine concentrations were determined with reference to the linear regression line obtained with the serial dilution data of each recombinant mouse cytokine.

Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical program GraphPad Prism version 6. First, the results were submitted to a normality test in order to evaluate if they had a Gaussian distribution. Parametric and non-parametric samples were analyzed by one-way Analysis of Variance (ANOVA test) and *Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test*, respectively. The probability was considered statistically significant if $p < 0.05$. Results were expressed as Mean $\pm$ SEM.

RESULTS

L. bulgaricus treatment inhibited tumor progression in AOM/DSS-induced model of colon carcinogenesis

In order to investigate whether *L. bulgaricus* would be able to inhibit the progression colorectal carcinogenesis, we compared tumor development in AOM/DSS-induced mice treated or not with the probiotic (Figura 1A). As shown in Figure 1, animals from both groups developed tumors at the end of the experimental protocol, whereas those treated with the probiotic developed fewer and smaller tumors. Mice of the control group developed, on average, 9 colorectal tumors, whereas animals treated with *L. bulgaricus* developed only 3 (Figure 1B). We also observed a total tumor volume about 4.4 fold lower in these treated animals (Figure 1C). In addition, animals receiving the probiotic showed tumors with a mean volume 3 times lower than the control group (Figure 1D and E). However, we did not observe any difference in the incidence of tumors (data not shown).

FIGURE 1. *Lactobacillus bulgaricus* inhibits tumor progression in AOM/DSS-exposed mice. (A) Prior to tumor induction, mice were treated 3 times with PBS or the probiotic by gavage (0.2 ml/mouse) for one week. After that, colitis-associated cancer was induced by intraperitoneal injection of a single dose of AOM, followed by 3 cycles of 2,5% DSS in drinking water for one week and normal drinking water for 2 weeks. After euthanasia, colons were longitudinally opened, washed and examined for multiplicity (B), total tumor volume (C) and mean tumor volume (D). The dimensions of colorectal tumors were measured with pachymeter and the volumes calculated as: (width)² x length/2. (E). Illustrative and endoscopic images of AOM/DSS-induced tumors.

***L. bulgaricus* attenuated intestinal inflammation in AOM/DSS-induced model of colon carcinogenesis**

Once inflammation plays a critical role in CAC carcinogenesis, we evaluated intestinal inflammation in AOM/DSS-induced mice treated with *L. bulgaricus*. To do so, we used three different parameters: body weight, disease score and colon length. Although we did not observe differences of body weight between control group and the group treated with *L. bulgaricus* (Figure 2A), we found differences in clinical signals. *L. bulgaricus*-treated mice had a lower clinical score on the 13th and 15th days after tumor initiation (Figure 2B). Thereafter, this pattern of response extended and became even more pronounced until the end of the 70 experimental days (Figure 2B). Such differences occurred specifically on days 35, 36, 47, 54, 56, 57 and 63, as illustrated in Figure 2B.

In addition to the reduction of the intestinal inflammation score, we observed that the treatment with *L. bulgaricus* attenuated the DSS-induced shortening of the colon (Figure C and D). Animals of the control group had a shorter colon extension when compared to the group that received the probiotic (Figure C and D).

FIGURE 2. *L. bulgaricus* attenuates intestinal inflammation in AOM/DSS-exposed mice. A. Relative body weight of AOM/DSS-induced mice treated or not with jacalin. B. Disease score. In order to determine the clinical score, we adopted a scoring system based on clinical signs such as weight loss, humid perianal region, presence of diarrhea, blood in the stool or perianal region, hyporeactivity and piloerection. C. Colon length was determined using graduated images processed in ImageJ. D. Illustrative images of colon extension. Results are expressed as mean $\pm$ EPM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

***L. bulgaricus* inhibits the production of proinflammatory cytokines in tumors and colons of AOM/DSS-induced mice**

Once we observed that *L. bulgaricus* regulates gut inflammation, we also measured the intestinal concentration of inflammatory mediators involved in CAC pathogenesis. In segments of the large intestine that did not present tumors (inflamed colon) we observed a reduction of at least 2-fold in the levels of the cytokines TNF- α , IL-1, IL-23 and IL-17 in *L. bulgaricus*-treated animals in comparison to controls (Figure 3). In contrast, increased concentrations of IFN- γ were also observed in these treated animals (Figure 3). We did not observe differences for IL-6 (Figure 3).

FIGURE 3. *Lactobacillus bulgaricus* regulates the production of intestinal proinflammatory cytokines in AOM/DSS-exposed mice. Segments of the colon were homogenized and the concentration of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IFN- γ e IL-23 per gram of tissue (colon) was determined by ELISA. Results expressed as mean $\pm$ SEM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Regarding the cytokines measured in tumor tissues, we observed a pattern very similar to that found in the inflamed colon. We observed a negative regulation of all analyzed cytokines, including IL-6, in mice treated with the probiotic. In addition, we again demonstrated an increase in IFN- γ levels induced by the treatment with *L. bulgaricus* (Figure 4).

FIGURE 3. *Lactobacillus bulgaricus* regulates the production of tumors proinflammatory cytokines in AOM/DSS-exposed mice. Segments of the colon were homogenized and the concentration of TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-17, IFN- γ e IL-23 per gram of tissue (colon) was determined by ELISA. Results expressed as mean $\pm$ SEM. Lb: *Lactobacillus bulgaricus*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

DISCUSSION

Recently, numerous prebiotics and probiotics are being investigated as antitumor agents due to their capacity to modulate inflammatory responses. Among probiotics, the genera *Lactobacillus* has been reported to exert immuno-regulating effects, including modulation of innate immune responses and promotion of humoral and cellular immunity [38, 39], suppression of pathogens and restoration of gut microbiota homeostasis [40] and to improve IBD [41]. In the present study, we used an experimental model of colitis-associated cancer to investigate the effects of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* on colon carcinogenesis. We showed that *L. bulgaricus* negatively regulated tumor progression, resulting in an expressive reduction of total tumor volume and mean size of tumors. In addition, the probiotic also attenuated the clinical signs of intestinal inflammation possibly inducing a decreases levels of intestinal IL-6, TNF- α , IL-17, IL-23 and IL-1 β . Finally, we also demonstrated an increase in IFN- γ levels in animals treated with *L. bulgaricus*. Together, our results evidence an anti-inflammatory role and consequent antitumor effect of *L. bulgaricus* on colitis-associated cancer.

Due to their involvement in the pathogenesis of IBDs and CAC, the development of strategies that target the inflammatory cytokines IL-6, TNF- α , IL-17, IL-23 and IL-1 β , such as *L. bulgaricus*, is of potential interest in the therapeutic field. The cytokine IL-1 β is found at high levels in several types of cancers and in CRC its expression is increased throughout the tumor progression [42, 43]. IL-1 β activates the Wnt pathway in colon cancer cells, promoting

their growth and invasion [44, 45]. TNF- α is an important inflammatory mediator whose effect has been implicated in several cellular events, such as cell proliferation, differentiation and cell death [46]. Anti-TNF therapies have been successfully used in IBD patients which confirms the crucial role of this cytokine in IBD and CAC development [47]. In a study using CAC model induced by AOM and DSS, Popivanova et al. [48] demonstrated increased expression of TNF- α in colonic tissue. A similar study [49] also corroborated the findings of Popivanova et al. [48].

In addition, we demonstrated that oral administration of *L. bulgaricus*, one of the most common natural inhabitants of the human gut, suppressed the intestinal production of the proinflammatory cytokine IL-17 in CAC. This cytokine has been reported to be dramatically up-regulated in colitis and colorectal tumors [50, 51, 52]. The differentiation of Th17 cells may occur in the presence of different combinations of the cytokines TGF- β , IL-6, IL-1 β and/or IL-23, while its maintenance requires only IL-23 and/or IL-1 β [53, 54, 55]. In this context, we also evaluated whether treatment with the probiotic *L. bulgaricus* could alter IL-23 levels. Our results show that *L. bulgaricus* induced a reduction in intestinal and tumor concentrations of IL-23, which would further justify the phenotype observed in our study.

Although we have not attempted to elucidate the molecular mechanisms that mediate the inhibitory role of *L. bulgaricus* in the regulation of IL-23 in our study, we suspect that reduced expression of TNF α may be responsible. In fact, previous studies have clearly shown that nuclear factor (NF- κ B), a critical mediator of TNF α signaling, regulates the transcription of the IL-23p19 gene [56]. A recent finding showed that the probiotics *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) inhibit LPS-induced expression of IL-23 in intestinal cells cultured in a condition of histone acetylation inhibition and increased DNA methylation [57]. This finding might provide another potential mechanism for the *L. bulgaricus*-mediated negative regulation of IL-23.

Only a few trials in IBD patients have examined the composition of intestinal microbiota before and after supplementation therapy, so the effect (if any) of administering probiotics to the resident microbiota is not fully understood. However, it has been suggested that probiotics can change the intestinal ecosystem by generating an ecological environment that is unfavorable to the growth of noxious species, increasing the number of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* and stabilizing the intestinal microbiota [58, 59]. Once bacteria compete for nutrients and produce substances that directly affect the growth of other bacteria, probiotics can provide a dual protection against a wide range of pathogens, including certain

forms of *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Pseudomonas*. Probiotics also produce metabolites (lactic acid, short chain fatty acids and hydrogen peroxide) and bacteriocins that inhibit some pathogenic bacteria [60]. Moreover, probiotics reduce the adhesion of pathogenic bacteria promoting the production of mucins [60, 61].

In conclusion, our results show an anti-inflammatory and antitumor role of *Lactobacillus bulgaricus* in colitis-associated carcinogenesis. Although the antitumor effects of *Lactobacillus bulgaricus* are promising, the mechanisms by which they occur still need to be elucidated. In any case, our study is extremely important as regards the potential use of new therapeutic agents that can mediate and/or regulate the progression of this type of cancer.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

DSCS and GPS contributed substantially to the design of the study; LCV and DSCS were in charge of the experimental protocol, analysis and interpretation of the results. EA, JCS and LCLJ contributed to interpretation of the results, statistical analysis and discussion of the manuscript. All authors interpreted the data and have contributed to writing, discussion and revised the manuscript critically. Also, all authors have given final approval of the version of the article to be published. DSCS and GPS had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Acknowledgments

We would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq, Brazil, which supported this research with regular doctoral scholarship to Denise Sayuri Calheiros da Silveira.

REFERENCES

- [1] L. A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 65, no. 2, pp. 87–108, 2015.
- [2] J. S. Lin, M. A. Piper, L. A. Perdue et al., "Screening for colorectal cancer: updated evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force," *Journal of the American Medical Association-JAMA*, vol. 315, no. 23, pp. 2576–2594, 2016.
- [3] N. C. A. Vermeer, H. S. Snijders, F. A. Holman et al., "Colorectal cancer screening: Systematic review of screen-related morbidity and mortality," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 54, pp. 87–98, 2017.
- [4] R. L. Siegel, K. D. Miller, S. A. Fedewa et al., "Colorectal cancer statistics, 2017," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 67, no. 3, pp. 177–193, 2017.
- [5] A. Lasry, A. Zinger, and Y. Ben-Neriah, "Inflammatory networks underlying colorectal cancer," *Nature Immunology*, vol. 17, no. 3, pp. 230–240, 2016.
- [6] T. Zenlea, and M. A. Peppercorn, "Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 12, pp. 3146–3152, 2014.

- [7] J. R. Marchesi, B. E. Dutilh, N. Hall et al., "Towards the human colorectal cancer microbiome," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 5, pp. e20447, 2011.
- [8] I. Sobhani, J. Taj, F. Roudot-Thoraval et al., "Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, pp. e16393, 2011.
- [9] P. Louis, G. L. Hold, H. J. Flint, "The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 12, no. 10, pp. 661–672, 2014.
- [10] N. Corcionivoschi, D. Drinceanu, I. M. Pop, et al., "The effect of probiotics on animal health," *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, vol. 43, no. 1, pp. 35–41, 2010.
- [11] L. Hooper, C. D. Summerbell, R. Thompson, et al., "Reduced or modified dietary fat for preventing cardiovascular disease," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 6, no. 7, pp. CD002137, 2011.
- [12] M. T. Liong, "Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 9, no. 5, pp. 854–863, 2008.
- [13] M. Uccello, G. Malaguarnera, F. Basile, et al., "Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention," *BMC Surgery*, vol. 12, no. 1, pp. S35, 2012.
- [14] E. S. L. Chong, "A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, no. 2, pp. 351–374, 2014.
- [15] L. Marinelli, G. C. Tenore, and E. Novellino, "Probiotic species in the modulation of the anticancer immune response," *Seminars in Cancer Biology*, In press, 2017.
- [16] G. D. Stoner, and H. Mukhtar, "Polyphenols as cancer chemopreventive agents," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 59, n. S22, pp.169-180, 1995.
- [17] S. S. Choi, Y. Kim, K. S. Han et al., "Effects of Lactobacillus strains on cancer cell proliferation and oxidative stress in vitro," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 42, no. 5, pp. 452–458, 2006.
- [18] E. Motevaseli, M. Shirzad, S. M. Akrami et al., "Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate," *Journal of Medical Microbiology*, vol. 62, no. 7, pp. 1065–1072, 2013.
- [19] Z. Nouri, F. Karami, N. Neyazi et al., "Dual anti-metastatic and anti-proliferative activity assessment of two probiotics on HeLa and HT-29 cell lines," *Cell Journal (Yakhteh)*, vol. 18, no. 2, pp. 127–134, 2016.
- [20] A. Tiptiri-Kourpeti, K. Spyridopoulou, V. Santarmaki et al., "Lactobacillus casei exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells," *PloS One*, vol. 11, no. 2, pp. e0147960, 2016.
- [21] S. Lebeer, J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker, S. C., "Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 72, no. 4, pp. 728–764, 2008.
- [22] E. Bansal, A. Garg, S. Bhatia, A. K. Attri, and J. Chander, "Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers," *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, vol. 51, no. 2, pp. 204–208, 2008.
- [23] K. Orrhage, E. Sillerstrom, J. A. Gustafsson, C. E. NOrd, and J. Rafter, "Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria," *Mutation Research*, vol. 311, no. 2, pp. 239–248, 1994.
- [24] O. Sreekumar, A. Hosono, "The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by Bifidobacterium longum and its cultured milk against some heterocyclic amines," *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 44, no. 11, pp. 1029–1036, 2011.
- [25] M. I. Massod, M. I. Qadir, J. H. Shirazi, and I. U. Khan, "Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 37, no. 1, pp. 91–98, 2011.
- [26] L. Zhong, X. Zhang, and M. Covasa, "Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 24, pp. 7878–7886, 2014.
- [27] J. P. Chouraqui, L. D. Van Egroo, and M. C. Fichot, "Acidified milk formula supplemented with bifidobacterium lactis: impact on infant diarrhea in residential care settings," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 38, no. 3, pp. 288–292, 2004.
- [28] D. Gaón, H. García, L. Winter et al., "Effect of Lactobacillus strains and Saccharomyces boulardii on persistent diarrhea in children," *Medicina (B Aires)*, vol. 63, no. 4, pp. 293–298, 2003.
- [29] E. Pohjavuori, M. Viljanen, R. Korpela et al., "Lactobacillus GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 114, no. 1, pp. 131–136, 2014.
- [30] P. Bourlioux, B. Koletzko, F. Guarner, and V. Braesco, "The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, no. 4, pp. 675–683, 2003.
- [31] M. A. Azcárate-Peril, M. Sikes, J. M. Bruno-Bárcena, "The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 301, no. 3, pp. G401–G424, 2011.
- [32] S. del Carmen S, A. M. de LeBlanc, A. Miyoshi, C. S. Rocha, V. Azevedo, and J. G. LeBlanc, "Potential application of probiotics in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases," *Ulcers*, vol. 2011, Article ID 841651, 13 pages,
- [33] T. Tanaka, H. Kohno, R. Suzuki, Y. Yamada, S. Sugie, H. Mori, "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate," *Cancer Science*, vol. 94, no. 11, pp. 965–973, 2003.
- [34] D. W. Rosenberg, C. Giardina, T. Tanaka, "Mouse models for the study of colon carcinogenesis," *Carcinogenesis*, vol. 30, no. 2, pp. 183–196, 2009.
- [35] M. J. Waldner, and M. F. Neurath, "Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development," *Seminars in Immunopathology*, vol. 31, no. 2, pp. 249–256, 2009.
- [36] H. Sales-Campos, P. J. Basso, V. B. F. Alves et al., "Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 48, no. 2, pp. 96–107, 2015.

- [37] U. Dougherty, R. Mustafi, Y. Wang et al., "American ginseng suppresses Western diet-promoted tumorigenesis in model of inflammation-associated colon cancer: role of EGFR." *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 11, pp. 111, 2011.
- [38] S. Cunningham-Rundles, S. Ahrné, S. Bengmark et al., "Probiotics and immune response," *American Journal of Gastroenterology*, vol. 95, no. 1, pp. S22–S25, 2000.
- [39] V. Delcenserie, D. Martel, M. Lamoureux, J. Amiot, Y. Boutin, D. Roy, "Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract," *Current Issues in Molecular Biology*, vol. 10, no. 1–2, pp. 37–54, 2008.
- [40] M. D. Collins, and G. R. Gibson, "Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 69, no. 5, pp. 1052S–7S., 1999.
- [41] J. M. Leung, M. Davenport, M. J. Wolff et al., "IL-22-producing CD4⁺ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue," *Mucosal Immunology*, vol. 7, no. 1, pp. 124–133, 2014.
- [42] E. Voronov, D. S. Shouval, Y. Krelm et al. "IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, no. 5, pp. 2645–2650, 2003.
- [43] G. Cui, H. Qi, M. D. Gundersen et al., "Dynamics of the IL-33/ST2 network in the progression of human colorectal adenoma to sporadic colorectal cancer," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 64, no. 2, pp. 181–190, 2015.
- [44] P. Kaler, L. Augenlicht, and L. Klampfer, "Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3," *Oncogene*, vol. 28, no. 44, pp. 3892–3902, 2009.
- [45] V. S. Li, S. S. Ng, P. J. Boersema et al., "Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex," *Cell*, vol. 149, no. 6, pp. 1245–1256, 2012.
- [46] Z. Liu, "Molecular mechanism of TNF signaling and beyond," *Cell Research*, vol. 15, no. 1, pp. 24–27, 2005.
- [47] J. R. Bradley JR, "TNF-mediated inflammatory disease," *Journal of Pathology*, vol. 214, no. 2, pp. 149–160, 2008
- [48] B. K. Popivanova, K. Kitamura, Y. Wu et al., "Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 2, pp. 560–570, 2008.
- [49] R. M. Stillie, H. L. Sapp, and A. W. Stadnyk, "TNFR1 deficiency protects mice from colitis-associated colorectal cancer coupled with a decreased level of oxidative damage in the colon: implications for anti-TNF therapy of unremitting colitis," *Scientific Research*, vol. 3, no. 6, 2012.
- [50] S. I. Grivennikov, K. Wang, D. Mucida et al., "Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth," *Nature*, vol. 491, no. 7423, pp. 254–258, 2012.
- [51] V. Holta, P. Klemetti, H. M. Salo et al., "Interleukin-17 immunity in pediatric crohn disease and ulcerative colitis," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 57, no. 3, pp. 287–292, 2013.
- [52] Y. S. Hyun, D. S. Han, A. R. Lee, C. S. Eun, J. Youn, H. Y. Kim, "Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer," *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 4, pp. 931–936, 2012.
- [53] X. O. Yang, B. Pappu, R. Nurieva et al., "T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ ," *Immunity*, vol. 28, no. 1, pp. 29–39, 2008.
- [54] Y. Chung, S. H. Chang, G. J. Martinez et al., "Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling," *Immunity*, vol. 30, no. 4, pp. 576–587, 2009.
- [55] R. Bailey, M. H. Nelson, R. A. Himes, Z. Li, S. Mehrotra, and C. M. Paulos, "Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis," *Front Immunol*, vol. 5, pp. 276, 2014.
- [56] S. Fiorucci, E. Distrutti, A. Mencarelli et al., "Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocyte cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis," *Digestion*, vol. 66, no. 4, pp. 246–256, 2002.
- [57] E. Miyauchi, T. Ogita, J. Miyamoto et al., "Bifidobacterium longum alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: Involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, pp. 1–11, 2013.
- [58] K. Kajander, E. Myllyluoma, M. Rajilic-Stojanovic et al., "Clinical trial: Multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 27, no. 1, pp. 48–57, 2008.
- [59] J. Zeng, Y. Q. Li, X. L. Zuo, Y. B. Zhen, J. Yang, C. H. Liu, "Clinical trial: Effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome," *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 28, no. 8, pp. 994–1002, 2008.
- [60] V. Lievin, "Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity," *Gut*, vol. 47, no. 5, pp. 646–652, 2000.