

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



**Dissertação**

**PERFIL SANGUÍNEO, ESTRESSE OXIDATIVO E DESEMPENHO  
ALIMENTAR DE CAMUNDONGOS *Swiss* SUPLEMENTADOS COM *Pichia  
pastoris* E IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA**

**Khadija Bezerra Massaut**

**Pelotas, 2018**

**KHADIJA BEZERRA MASSAUT**

**PERFIL SANGUÍNEO, ESTRESSE OXIDATIVO E DESEMPENHO  
ALIMENTAR DE CAMUNDONGOS *Swiss* SUPLEMENTADOS COM *Pichia  
pastoris* E IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA**

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

Orientadora: Ângela Nunes Moreira  
Co-orientador: Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M414p Massaut, Khadija Bezerra

Perfil sanguíneo, estresse oxidativo e desempenho alimentar de camundongos swiss suplementados com pichia pastoris e imunossuprimidos com ciclofosfamida / Khadija Bezerra Massaut ; Angela Nunes Moreira, orientadora ; Fabrício Rochedo Conceição, coorientador. — Pelotas, 2018.

142 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Probiótico. 2. Levedura. 3. Quimioterapia. 4. Hemograma. 5. Modelo animal. I. Moreira, Angela Nunes, orient. II. Conceição, Fabrício Rochedo, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

**Khadija Bezerra Massaut**

**PERFIL SANGUÍNEO, ESTRESSE OXIDATIVO E DESEMPENHO  
ALIMENTAR DE CAMUNDONGOS *Swiss* SUPLEMENTADOS COM *Pichia  
pastoris* E IMUNOSSUPRIMIDOS COM CICLOFOSFAMIDA**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28 de agosto de 2018

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup> Dra. Ângela Nunes Moreira (orientadora)

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Costa Valle

Doutora em Ciência Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Rodrigo Gil de Los Santos

Doutor em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas

## Agradecimentos

Primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela capacidade que me foi dada para concluir mais esta etapa.

A minha família, mãe e tias, que jamais mediram esforços para que eu pudesse realizar os meus objetivos, obrigada pelo abrigo, apoio, consolo, carinho e pelas palavras (e mimos) que traziam alento ao meu coração. Amo vocês, as minhas conquistas são suas também!

Aos meus irmãos, por cederem seu espaço e aguentarem minhas reclamações, as vezes diárias, sobre barulho e bagunças.

À minha amada Vó, que onde quer que esteja, sei que zela por mim e me inspira a ser uma pessoa melhor.

Aos queridos amigos do PPGNA, presentes que o mestrado me deu, vocês foram imprescindíveis nesta trajetória.

A Ti, grande amiga que o retorno a Pelotas permitiu reencontrar, parceira de todas as horas e falas. Obrigada por tudo 'miga'!

A Lislei e Letícia, grandes colegas e amigas, que me ensinaram a trilhar o caminho da experimentação, sempre dispostas a ajudar.

Aos colegas do Lab 6, que me acolheram, especialmente à Gi, Lucas e Marcos, sempre dispostos a parar suas atividades para ajudar e explicar os processos. Obrigada pela paciência, amizade e ajuda de todas as horas.

Ao Rafa e a Giuli, meus bolsistas queridos, que me acompanharam e 'sofreram' comigo. Obrigada por toda ajuda na execução desse projeto.

A equipe do Biotério Central da UFPel, sempre disponível para ajudar nos procedimentos e carinhosa quando as coisas não aconteciam como era desejado, mas, especialmente agradeço à Ane, pelo apoio fundamental e ilimitado em todas as fases desse projeto. Não sei o que eu faria sem tua ajuda!

Agradeço também a minha orientadora Ângela, por me apresentar o mundo dos probióticos, por acreditar na minha capacidade, por toda ajuda dada, por não me deixar desistir e possibilitar essa conquista.

E a todos os demais colaboradores, que foram muitos, e para não correr o risco de esquecer, não irei citá-los. O meu muito obrigada de coração, por toda ajuda e conhecimento compartilhado. Sem vocês este projeto não seria nada. Os levarei para sempre comigo.

“Ninguém pode voltar atrás e fazer um novo começo,  
mas qualquer um pode começar agora  
e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

## Resumo

MASSAUT, Khadija Bezerra. **Perfil sanguíneo, estresse oxidativo e desempenho alimentar de camundongos Swiss suplementados com *Pichia pastoris* e imunossuprimidos com ciclofosfamida**. 2018, 142p. (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2018.

De ação sistêmica, a quimioterapia é uma das principais terapias para tratamento do câncer, sendo a ciclofosfamida (CF) o antineoplásico mais utilizado. Entretanto, devido sua ação tóxica, são associados ao fármaco inúmeros efeitos colaterais como imunossupressão, alteração dos parâmetros de estresse oxidativo, hepatotoxicidade e perda de peso. A administração de probióticos como alternativa na modulação do sistema imune e promoção da melhora nesses parâmetros vem sendo estudada. A levedura *Pichia pastoris* é comumente usada para produção de proteínas recombinantes em larga escala, e alguns estudos vêm demonstrado que essa levedura possui propriedades probióticas. Porém, seu efeito sobre a imunossupressão e o estresse oxidativo induzidos pelo tratamento com CF ainda não foram avaliados. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *P. pastoris* sobre o perfil sanguíneo, estresse oxidativo e desempenho alimentar em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos Swiss. Para tal fim, 30 camundongos machos Swiss com 28 dias de idade, foram segregados em quatro grupos: grupo controle; grupo imunossuprimido por CF (uma dose de 150 mg/kg de peso no dia 13 e outra de 100 mg/kg de peso no dia 16 do estudo); grupo suplementado diariamente com  $10^8$  UFC/animal de *P. pastoris* por gavagem, a partir de 12 dias antes da imunossupressão até o fim do estudo; e grupo imunossuprimido com CF e suplementado com a levedura. Foram analisados o hemograma completo, marcador renal, perfil lipídico, glicose, estresse oxidativo, histopatologia, variação de peso e consumo alimentar, sendo considerado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A suplementação com a levedura, além de segura, significativamente evitou a leucopenia e neutropenia, sinalizou melhora nos parâmetros do eritrograma e na contagem de linfócitos, reduziu a peroxidação lipídica e a ocorrência de lesões nos rins, reduziu o estresse oxidativo no encéfalo e melhorou a conversão alimentar no grupo que recebeu o fármaco. E, nos animais saudáveis, além de segura, foi significativamente benéfica na eficiência alimentar, aumento do leucograma e eritrograma, e na redução da peroxidação lipídica nos rins e encéfalo. Conclui-se que a levedura apresenta propriedades probióticas e é segura para administração em animais sadios e imunossuprimidos.

**Palavras chave:** probiótico, levedura, quimioterapia, hemograma, modelo animal.



## Abstract

MASSAUT, Khadija Bezerra. **Blood profile, oxidative stress and feed performance of Swiss mice supplemented with *Pichia pastoris* and immunosuppressed with cyclophosphamide.** 2018, 142p. (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2018.

Of systemic action, chemotherapy is one of the main therapies for cancer treatment, with cyclophosphamide (CF) being the most used antineoplastic. However, due to its toxic action, numerous side effects such as immunosuppression, alteration of parameters of oxidative stress, hepatotoxicity and weight loss are associated with the drug. The administration of probiotics as an alternative in the modulation of the immune system and promotion of the improvement in these parameters has been studied. *Pichia pastoris* yeast is commonly used to produce recombinant proteins on a large scale, and some studies have shown that this yeast has probiotic properties. However, its effect on immunosuppression and oxidative stress induced by treatment with CF have not been evaluated. The objective of the present study was to evaluate the effect of supplementation with *P. pastoris* on blood profile, oxidative stress and feed performance in a model of immunosuppression induced by CF chemotherapy in Swiss mice. To that end, 30 Swiss male mice with 28 days of age were segregated into four groups: control group; (a dose of 150 mg/kg body weight on day 13 and another dose of 100 mg/kg body weight on day 16 of the study); group supplemented daily with  $10^8$  CFU / animal of *P. pastoris* per gavage, from 12 days before immunosuppression until the end of the study; and immunosuppressed CF group and supplemented with yeast. The complete blood count, renal marker, lipid profile, glucose, oxidative stress, histopathology, weight variation and food consumption were analyzed, being considered a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ). Besides safe yeast supplementation, it significantly avoided leukopenia and neutropenia, signaled improvement in erythrogram parameters and lymphocyte counts, reduced lipid peroxidation and the occurrence of kidney damage, reduced oxidative stress in the brain, and improved feed conversion ratio in the group receiving the drug. And in healthy animals, in addition to being safe, it was significantly beneficial in food efficiency, increased leukogram and

erythrogram, and in the reduction of lipid peroxidation in the kidneys and encephalon. It is concluded that yeast presents probiotic properties and is safe for administration in healthy and immunosuppressed animals.

**Key words:** probiotic, yeast, chemotherapy, blood count, animal model.

## Lista de tabelas

- Tabela 1:** Médias,  $\pm$  desvio padrão, do hemograma por grupo, de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com CF e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle) no dia zero (doze dias antes da 1ª dose de CF), médias  $\pm$  desvio padrão do hemograma e dos parâmetros bioquímicos por grupo, no dia 17 (um dia após a 2ª dose de CF). Valores de  $p < 0,05$  são identificados por letras maiúsculas para comparativo inicial e final e minúsculas para dados do dia 17 (Anova), e testes de múltipla comparação são identificados por \* (Tukey, entre grupos) e  $\alpha$  (Bonferroni, entre períodos)..... 96
- Tabela 2:** Médias  $\pm$  desvio padrão do peso por animal e consumo diário de ração por grupo, de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C), no dia zero (doze dias antes da 1ª dose de CF), dia 13 (dia da 1ª aplicação da CF) e dia 17 (após a 2ª dose de CF), e índices de conversão alimentar (ICA) e de eficiência alimentar (IEA) nos períodos avaliados (n=29). Valores de  $p < 0,05$  são identificados por letras maiúsculas para análise de variância (Two-way Anova), testes de múltipla comparação são identificados por \* (Tukey, entre grupos),  $\alpha$  (Bonferroni, entre períodos) e  $\omega$  (teste T)..... 106
- Tabela 3:** Médias  $\pm$  desvio padrão de concentrações finais (dia 17) dos marcadores de estresse oxidativo TBARS e catalase, por tecido por grupo, de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C) (n=29). Valores de  $p < 0,05$  são identificados por letras maiúsculas para análise de variância (Two-way Anova) \* para teste de múltipla comparação (Tukey, entre grupos) e  $\omega$  (teste T).....109

## Lista de figuras

**Figura 1:** Razão entre contagens final (dia 17) e inicial (dia 0) de leucócitos totais (A, células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) e linfócitos (B, células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (Tukey) ( $n=20$ )..... 99

**Figura 2:** Médias da contagem de hemácias (A,  $\times 10^6 \text{cels}/\text{mm}^3$ ), dosagem de hemoglobina (B, g/dL) e da porcentagem do hematócrito (C, %) no dia 17 (final) e média do VCM (D, fL) nos dias zero (I=inicial) e 17 (F=final), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (Tukey) e no período (Bonferroni) ( $n=20$ )..... 102

**Figura 3:** Médias dos níveis séricos de colesterol total no dia 17 (final), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C), CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova e teste de Bonferroni ( $n=29$ )..... 103

**Figura 4:** Peso (A, g/grupo) nos dias zero, 13 e 17, ganho de peso por dia (B, g/animal) entre os dias zero e 17 (período total do experimento) e ganho de peso por dia (C, g/animal) entre os dias 13 e 17 (período de imunossupressão), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF

foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (Tukey) ( $n=29$ )..... 105

**Figura 5.** Consumo diário de ração (A, g/grupo) nos dias zero, 13 e 17 e índice de eficiência alimentar (B), entre os dias 13 e 17, de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (Tukey) ( $n=29$ )..... 108

**Figura 6.** Níveis de TBARS (nmol de MDA/g de tecido) no rim (A) e encéfalo (B) no dia 17 (final, um dia após a 2ª dose de CF), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são representadas por \*, utilizando o teste Two-way Anova e Tukey (B) ( $n=29$ )..... 110

**Figura 7.** Níveis de catalase (UCAT/mg de tecido) no fígado (A) e encéfalo (B) no dia 17 (final, um dia após a 2ª dose de CF), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como média  $\pm$  desvio padrão em Log e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (Tukey) ( $n=29$ )..... 111

**Figura 8.** Número de animais com e sem lesão renal no dia 17 (um dia após a 2ª dose de ciclofosfamida - CF), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P.*

*pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Foi utilizado teste exato de Fischer para determinação das diferenças significativas  $p < 0,05$  (n=29)..... 112

### Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CF	Ciclofosfamida
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FAO	Food and agriculture organization
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona-S- transferase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDA	Malondialdeído
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PP	<i>Pichia pastoris</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>S. boulardii</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral – alfa

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	16
<b>2. Justificativa</b> .....	20
<b>3. Revisão de literatura</b> .....	21
3.1 Efeito deletério do tratamento quimioterápico .....	21
3.2 Ciclofosfamida e seu efeito citotóxico .....	21
3.3 Probióticos e seu efeito modulador .....	23
3.4 Efeito dos probióticos sobre a imunossupressão .....	25
3.5 Efeito dos probióticos no estresse oxidativo .....	26
3.6 <i>Pichia pastoris</i> .....	27
<b>4. Objetivos</b> .....	31
4.1 Objetivo geral .....	31
4.2 Objetivos específicos .....	31
<b>5. Hipóteses</b> .....	32
<b>6. Projeto</b> .....	33
<b>7. Relatório do trabalho de campo</b> .....	86
<b>8. Artigo</b> .....	87
<b>Referências</b> .....	130



## 1. Introdução

O câncer é uma enfermidade que se caracteriza pelo crescimento desordenado de células malignas. Seu tratamento pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea, hormonioterapia de forma isolada ou, em muitos casos, com associação de mais de uma modalidade (BRASIL, 2013; INCA, 2017; ONCOGUIA, 2017).

A abordagem sistêmica da quimioterapia, tratamento que utiliza medicação antineoplásica, permitindo o combate ao câncer através da destruição, controle ou inibição das células cancerígenas no indivíduo, tornando possível a cura de alguns tumores, e permite o tratamento precoce de metástases não detectáveis (RODRIGUES & POLIDORI, 2012; INCA, 2017; ONCOGUIA 2017). Entretanto, os agentes quimioterápicos afetam as células com alta capacidade de replicação – tumoral e não tumoral, desencadeando diversos efeitos colaterais (CALIXTO-LIMA et al., 2012; INCA, 2015b; INCA, 2017).

A ciclofosfamida (CF), comumente utilizada no tratamento contra o câncer, é o agente antineoplásico do tipo alquilante de maior potência nas terapias imunossupressoras disponíveis, pois impede a divisão celular e inibe a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) (UPTODATE, 2017). Também é utilizada como agente imunossupressor no transplante de órgãos e no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico, podendo até mesmo, ser administrada para tratar doenças benignas (CETIK et al., 2015).

Apesar de muito eficaz, sua utilização é limitada devido ao alto potencial tóxico secundário, tanto no curto quanto no longo prazo (MCCUNE et al., 2017). O tratamento com CF pode comprometer a função de células do sistema imune, como os leucócitos (SALVA et al., 2014), afetando a capacidade de migração dos neutrófilos (MENDONÇA et al., 2006), induzindo o aumento de marcadores de estresse oxidativo e o nível de citocinas (FABER et al., 2011), aumentando a permeabilidade intestinal (YANG et al., 2013) e gerando hepatotoxicidade (WAITZBERG, 2006). Motivos pelos quais, os pacientes devem ser monitorados regularmente quanto à função hepática, renal e da medula óssea (WAITZBERG, 2006).

Os profissionais da área da saúde têm buscado proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes em tratamento medicamentoso, voltando sua atenção cada vez mais para os efeitos benéficos proporcionados pelos alimentos ditos funcionais (FAO, 2006).

De acordo com Jankovic et al. (2010), pesquisas relacionadas a probióticos – microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (FAO, 2006) – tem-se mostrado uma valiosa fonte de dados quanto às vantagens de suas aplicações, uma vez que podem desempenhar papel expressivo no sistema imunológico, digestivo e nas funções respiratórias, além de contribuir significativamente para aliviar doenças infecciosas em crianças e em populações saudáveis e ser utilizados como meio para evitar determinadas patologias, através da modulação do sistema imune (FAO, 2006), papel este também desempenhado em animais conforme relatado por Saad et al. (2006), inclusive quando imunocomprometidos pelo uso de CF (SALVA et al., 2014).

Entre os probióticos mais utilizados, estão algumas espécies de bactérias produtoras de ácido láctico do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. As leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* mostram-se particularmente promissoras, pois possuem vantagem em relação às bactérias, por não serem inibidas por substâncias antibacterianas (MARTINS et al., 2005).

Salva et al. (2014), ao analisar a influência de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos *Swiss* imunocomprometidos pela aplicação de CF, observou valores de leucócitos e neutrófilos positivamente maiores nos grupos tratados com *Lactobacillus*. Contraditoriamente, em outro estudo com camundongos BALB/c, concluiu-se que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não causou efeito na modulação da imunossupressão induzida pelo mesmo fármaco (BUJALANCE et al., 2007), reportando à necessidade de maiores investigações acerca do tema.

*Pichia pastoris* é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que pode ser empregada na produção de proteínas recombinantes em larga escala para o desenvolvimento de vacinas (STORCH, 2008; DUMMER et al., 2009 a; DUMMER et al., 2009 b; NIZOLI et al., 2009; KLAFFKE et al., 2016;

SIEDLER et al., 2017). Destacando-se também, pela sua capacidade de crescimento a partir de resíduos de baixo custo e meios de cultura relativamente simples, possibilitando sua produção em larga escala industrial (CREGG, 2017).

Estudos prévios, realizados na Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), tem avaliado o potencial probiótico de *P. pastoris*. Gil de Los Santos et al. (2012) observaram que *P. pastoris* e sua variante recombinante melhoraram a conversão alimentar e aumentaram significativamente o ganho de peso e a soroconversão contra *C. perfringens* de frangos de corte, sem causar alterações histopatológicas significativas. França et al. (2015) encontraram potencial efeito antimicrobiano de *P. pastoris* ao desafiarem camundongos BALB/c suplementados com a levedura contra *Salmonella Typhimurium* e observarem proteção, indicando que esta levedura além de possuir facilidade de manipulação genética, apresenta-se como um portador de moléculas biofuncionais em alimentos para animais. Além disso, concluíram que esta levedura é inócua, e é capaz de resistir à passagem através do trato gastrointestinal (TGI) de mamíferos e de inibir o crescimento de *S. Typhimurium in vitro*. E no intuito de explorar mais os potenciais efeitos probióticos desta levedura, Cunha (2016) realizou estudos adicionais avaliando a variação de peso, as contagens de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos, a peroxidação lipídica avaliada por TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) e a segurança de sua utilização em camundongos *Swiss* imunossuprimidos. A levedura apresentou efeito protetor à hepatotoxicidade causada pela aplicação da CF, estimulou o ganho de peso, protegeu os animais da leucopenia e neutropenia decorrentes da administração deste fármaco, uma vez que foi capaz de aumentar significativamente o número de células dos animais saudáveis e submetidos ao tratamento quimioterápico, e reduziu os níveis de TBARS no rim e cérebro dos animais tratados com CF e no fígado e cérebro de animais saudáveis.

Entretanto, embora a *P. pastoris* apresente benefícios comprovados e efeitos potenciais em camundongos *Swiss* submetidos à quimioterapia com CF, as implicações desta levedura em modelos de imunossupressão sobre outros parâmetros bioquímicos como o hemograma completo, colesterol total, triglicerídeos, glicose, bem como sobre outros parâmetros de estresse oxidativo

ainda necessitam de maiores investigações. Além disso, no estudo de Cunha (2016) os resultados referentes ao leucograma foram avaliados somente comparando as contagens após a imunossupressão, não sendo avaliada a redução das contagens das células entre o início do experimento e após a imunossupressão. Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e índices de desempenho alimentar, em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*.

## 2. Justificativa

Alguns probióticos são capazes de promover redução dos efeitos colaterais do tratamento quimioterápico com CF, por estarem associados a uma melhora na função imunológica e redução da peroxidação lipídica. A levedura *P. pastoris*, apesar de pouco estudada, tem demonstrado resultados promissores como probiótico. Entretanto, ainda não existem dados relativos quanto ao comportamento dessa levedura sobre o perfil hematimétrico e bioquímico de animais saudáveis e com imunossupressão causada pelo tratamento quimioterápico com CF. Ademais, considera-se relevante a avaliação concomitante de marcadores de estresse oxidativo e índices de desempenho alimentar nesses modelos por acreditar-se que a utilização da *P. pastoris* pode melhorar tais parâmetros e assim, futuramente, apresentar-se como uma opção satisfatória, e com melhor custo benefício, para melhorar a qualidade de vida e o prognóstico de pacientes oncológicos em tratamento quimioterápico com CF.

### **3. Revisão de literatura**

#### **3.1 Efeito deletério do tratamento quimioterápico**

Tendo como principal característica a capacidade de multiplicação e infiltração de células malignas, o câncer é uma enfermidade cujo tratamento pode ser realizado de forma isolada ou em combinação, sendo a quimioterapia, por sua abordagem sistêmica, a conduta mais utilizada (BRASIL, 2013; INCA, 2017; ONCOGUIA, 2017).

Estudos revelam que a medicação antineoplásica é eficaz porque viabiliza o combate ao câncer através da destruição, controle ou inibição das células cancerígenas no indivíduo, tornando possível a cura de alguns tumores e, além disso, permite também o tratamento precoce de metástases não detectáveis (RODRIGUES & POLIDORI, 2012; INCA, 2017; ONCOGUIA 2017). Entretanto, os agentes quimioterápicos acometem as células com alta capacidade de replicação – tumoral e não tumoral, desencadeando inúmeras reações adversas. Reações estas, que variam de forma dependente não só da dose, como também do tipo de substância administrada, caracterizando-se como agudas ou crônicas, cujo efeito tóxico pode surgir de forma precoce, imediata, tardia ou ultra-tardia (CALIXTO-LIMA et al., 2012; INCA, 2015b; INCA, 2017).

Via de regra, os efeitos colaterais estão associados a todas as classes de agentes antineoplásicos – mostardas nitrogenadas, alquil sulfonados, nitrozuréis e triazenos – sendo os agentes alquilantes, os mais comumente usados, por serem considerados ciclo-celular não específicos, ou seja, possuem capacidade de erradicar as células tumorais independentemente de estarem no ciclo celular ou em repouso (ALMEIDA et al., 2005; FERDINANDI & FERREIRA, 2009).

#### **3.2 Ciclofosfamida e seu efeito citotóxico**

A CF é um pró-fármaco, metabolizado no fígado e excretado pelos rins, que pode ser administrado por via oral ou intravenosa (MCCUNE et al., 2017; WAITZBERG, 2006). Pró-fármacos, são fármacos em sua forma inativa (ou expressivamente menos ativa) que quando administrados, passarão por uma biotransformação *in vivo*, produzindo metabólitos ativos, que irão favorecer sua

absorção ou ação. A metabolização da CF no fígado, forma dois compostos, a fosfaramida e a acroleína, sendo a primeira responsável pelo maior efeito citotóxico desta (EMADI et al., 2009). Entretanto, há relatos sobre a associação da acroleína principalmente à ocorrência de estresse oxidativo, através da depleção de GSH e de desenvolvimento de cistite hemorrágica (ABRAHAM et al., 2011).

Vale ressaltar que todo e qualquer agente quimioterápico possui capacidade de afetar a produção de células sanguíneas na medula óssea, através de seu potencial de toxicidade, estabelecendo-se como um efeito colateral do tratamento (SILVEIRA et al., 2016; COP, 2018; OC, 2018), entretanto, a CF, apresenta-se como um agente alquilante capaz de desencadear mielossupressão, cujas alterações hematológicas mais comumente observadas são leucopenia, trombocitopenia e anemia. Todavia, é necessário salientar que os danos à medula óssea podem ocorrer em diferentes graus, de forma dependente do fármaco, da dose e do tempo utilizado (FERDINANDI & FERREIRA, 2009; SILVEIRA et al., 2013). Além do mais, a administração dessa medicação acarreta outros efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, alopecia, dermatite, amenorréia, oligospermia, esterilidade, pneumonite, cistite hemorrágica e cardiotoxicidade (SANTOS et al., 2007; UPTODATE, 2017; MCCUNE et al., 2017).

Sabe-se ainda, que agentes quimioterápicos, como a CF, são capazes de promover aumento do estresse oxidativo, como já evidenciado por diversos autores (TRIPATHI & JENA, 2010; ABRAHAM & RABI, 2011; EL-SHEIKH & RIFAAI, 2014). Tal evento, ocorre em ocasiões nas quais existe desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes e antioxidantes, com predominância do primeiro (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Além dos danos já mencionados, estudos realizados com animais relatam que a utilização de medicamentos antineoplásicos pode desencadear a perda de peso (KANNO et al., 2009; FABER et al., 2011; EL-SHEIK & RIFAAI, 2014).

Faber et al. (2011) observaram que camundongos C3H/HeN apresentaram redução no número de linfócitos e de células brancas totais após aplicação de CF, sendo tal efeito também evidenciado por Zuluaga et al. (2006), os quais testaram uma dose reduzida de CF seria capaz de gerar neutropenia,

a fim de estabelecer um modelo de imunossupressão experimental simplificado. Os resultados obtidos pelos autores foram satisfatórios, onde a neutropenia severa foi alcançada ainda no 4º dia, quando foi administrada a segunda dose de CF; a leucopenia foi atingida 16 horas após a segunda dose do fármaco (no 5º dia de tratamento); e, a contagem de linfócitos e monócitos sofreram redução de 92% e 96% respectivamente, também ao 5º dia de tratamento. Por este motivo, o protocolo de imunossupressão utilizado no presente estudo foi o descrito por Zuluaga et al. (2006).

### **3.3 Probióticos e seu efeito modulador**

A microbiota intestinal de seres humanos quando saudável e microbiologicamente equilibrada, acarreta em um desempenho normal das funções fisiológicas, uma vez que participa do metabolismo dos produtos alimentares, provê fatores essenciais de crescimento, protege contra infecções por micro-organismos altamente virulentos e estimula o sistema imunológico (TORTORA et al., 2005; SAAD et al., 2006; SANTOS & VARAVALLO, 2011). Suas bactérias reforçam constantemente as diversas linhas de defesa do intestino através de mecanismos como a exclusão imunológica e a regulação e eliminação de caráter imune, que permitem o estabelecimento desta convivência dinâmica entre os seres humanos e os micro-organismos assegurando assim, uma melhoria na qualidade de vida (MAJAMAA & ISOLAURI, 1997; COSTA & VARAVALLO, 2011).

Espécies de bifidobactérias e lactobacilos (bactérias que constituem o microbioma humano) degradam substâncias não-absorvíveis pelo hospedeiro, sendo capazes de promover benefícios para o mesmo. Esses tipos de bactérias podem ser administrados em doses controladas, incluídas geralmente em bebidas lácteas fermentadas, comprimidos ou pós. A esses microrganismos confere-se genericamente a denominação de probióticos (CUPPARI, 2002; TORTORA et al., 2005).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2002), probióticos são micro-organismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas conferem efeitos benéficos, através do equilíbrio intestinal, sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro.



Tem sido conferido aos probióticos, três plausíveis mecanismos de ação. O primeiro é a redução da quantidade de células patogênicas viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, da competição por nutrientes e da competição por sítios de adesão. O segundo, seria alteração do metabolismo microbiano, por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro constituiria no estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e/ou da atividade dos macrófagos (SAAD et al., 2006). Logo, algumas cepas, promoveriam não só a regulação da microbiota, como também, seriam capazes de modular o sistema imune do hospedeiro, agindo de forma direta no desenvolvimento e regulação da imunidade local e sistêmica (GENEROSO et al., 2010; CASTELLI, 2011; CARREIRO, 2013; SALVA et al., 2014).

Jankovic et al., (2010) relataram que estudos referentes a probióticos tem demonstrado inúmeros dados positivos sobre os benefícios de sua utilização, uma vez que podem desempenhar papel significativo no sistema imunológico, reduzir a incidência, duração e seriedade de patologias digestivas e intestinais (CUPPARI, 2002), intervir de maneira positiva nas funções respiratórias, e em populações saudáveis, pode ser utilizado como veículo para evitar determinadas enfermidades, modulando o sistema imune (FAO, 2006), papel este que também pôde ser observado em estudos com animais (SAAD et. al. 2006), inclusive quando imunocomprometidos pelo uso de CF (BUJALANCE et al., 2007; SALVA et al., 2014).

Entre os probióticos usados com maior frequência em humanos e animais, encontram-se algumas espécies de bactérias produtoras de ácido láctico do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Segundo Vanderehoof (2008), os benefícios dos probióticos são estirpe específicos, e resultados benéficos produzidos por algumas estirpes já foram evidenciados em ensaios clínicos. Contudo, é necessário lembrar que nem todas as cepas que possuem eficácia comprovada são adequadas para uso em todas as indicações (BADARÓ et al. 2008).

Diversos estudos têm relatado não só a capacidade de regular a microbiota intestinal, mas também o potencial modulador do sistema imune

proporcionado pela administração de probióticos (CASTELLI, 2011; COSTA & VARAVALLO, 2011; CARREIRO, 2013; SALVA et al., 2014).

*Lactobacillus* têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais que relacionam probióticos com a resposta imune (BUJALANCE et al, 2007; LIBOREDO et al, 2010; SALVA et al, 2014), além de espécies de *Bifidobacterium* e da levedura *Saccharomyces boulardii*.

As leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* mostram-se particularmente promissoras, pois possuem vantagens em relação às bactérias, não sendo inibidas por antibacterianos e possuindo a capacidade de serem eliminadas rapidamente após a interrupção da terapia (BLEHAUT et al., 1989; BODDY et al., 1991).

Em um estudo para avaliar o sinergismo dos probióticos *S. boulardii* e *Bacillus cereus* Toyoi sobre a imunomodulação em camundongos, Castelli (2011) observou que os marcadores de imunidade humoral apresentaram níveis significativamente superiores quando os micro-organismos foram administrados concomitantemente, quando comparados ao grupo controle e na sua forma isolada.

### **3.4 Efeito dos probióticos sobre a imunossupressão**

Responsável pela defesa do organismo contra agentes tóxicos ou infecciosos, o sistema imune é constituído por uma rede de órgãos, células e moléculas (GUYTON & HALL, 2002). Segundo Carreiro (2013), 70 % do sistema linfóide encontra-se no intestino, estando presentes linfócitos T, B e fagócitos, assim, 20% das células intestinais seriam linfócitos e não enterócitos.

A imunidade inata opera em conjunto com a imunidade adaptativa e caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independe de estímulo prévio, constituindo a primeira linha de defesa do organismo, porém, a utilização de quimioterápicos, como a CF, pode ocasionar efeitos nocivos neste sistema de defesa (CRUVINEL et al., 2010). De acordo com Zuluaga et al. (2006), a administração de CF em camundongos albinos *Swiss*, mesmo em um regime simplificado, de 250 mg/kg, é capaz de reduzir as células do sistema imune, ocasionando uma neutropenia severa, assim como uma redução de 92% e 96% de linfócitos e monócitos, respectivamente.

Micro-organismos probióticos e patogênicos convivem em constante disputa por sítios de adesão e substratos no intestino, por este motivo, de um modo geral, uma microbiota saudável auxiliaria a impedir o crescimento de patógenos. Dentre os múltiplos benefícios associados aos probióticos, podem ser destacados: antagonismo à patógenos, estímulo à imunidade, ação anti-carcinogênica, produção intestinal de citocinas anti-inflamatórias e redução das pró-inflamatórias, além de prevenção e tratamento de diversas patologias (SAAD et al., 2006; SALVA et al., 2014; CARREIRO, 2013).

Salva et al. (2014), ao analisarem o efeito de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos *Swiss* sob imunossupressão pela aplicação de CF, observaram maiores valores de leucócitos e neutrófilos nos grupos tratados com *Lactobacillus*, dados que corroboram com os resultados de Wei et al. (2007), ao verificarem que os camundongos imunocomprometidos por CF, após receberem a suplementação de *Lactobacillus rhamnusus* ZDY114 e colostro bovino melhoraram as funções do sistema imunológico. Contudo, outro estudo, com camundongos BALB/c, verificou que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não causou efeito na modulação da imunossupressão induzida por este fármaco (Bujalance et al., 2007).

Já em um experimento realizado por Liboredo et al. (2010), constatou-se que houve menor mortalidade nos animais tratados com bifidobactérias (30%), seguido do grupo com suplementação de lactobacilos (40%), sendo o índice maior no grupo cuja combinação destes micro-organismos foi distribuída (60%), ocorrendo principalmente 48h a 72h após a primeira aplicação do fármaco 1,2-dimethylhydrazine (DMH).

### **3.5 Efeito dos probióticos no estresse oxidativo**

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico, ao cumprir funções biológicas relevantes na atuação como mediadores nas várias reações bioquímicas. Sua produção, quando adequada, possibilita a geração de energia; fertilização do óvulo; ativação de genes; e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção, por exemplo. Porém, em excesso, pode conduzir a danos oxidativos (Shami & Moreira, 2004; Barbosa et al., 2010 *apud* Ferreira & Matsubara. 1997)

Quando há desequilíbrio entre os fatores antioxidantes e pró-oxidantes, com predomínio dos pró-oxidantes (radicais livres), ocorre o estresse oxidativo e, para que os níveis fisiológicos permaneçam normais, existe o sistema de defesa antioxidante, o qual é essencial para impedir os danos oxidativos e consequentemente, os danos sistêmicos provocados pelos radicais livres (Barbosa et al., 2010).

Estudos realizados com ratos demonstraram que a CF induz ao estresse oxidativo através do aumento da peroxidação lipídica e da redução da atividade de várias enzimas antioxidantes (Tripathi & Jena, 2010; Abraham & Rabi, 2011). Rehman et al. (2012) observaram que camundongos *Swiss* submetidos a tratamento com CF demonstraram maiores níveis de nitrogênio uréico no sangue e creatinina, quando comparados ao grupo controle.

Amaretti et al. (2013), ao avaliarem o potencial antioxidante de diversas cepas de bactérias ácido-lácticas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcuse Streptococcus thermophilus*) utilizadas concomitantemente, puderam observar um efeito na redução do estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico doxorubicina. Em relação ao efeito do probiótico *B. cereus Toyoi* sobre os parâmetros de estresse oxidativo em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina, Bampi et al. (2015) relatou que o nível do marcador de estresse oxidativo TBARS foi menor no grupo suplementado com *B. cereus Toyoi*. Além disso, observou-se também que este micro-organismo, em camundongos diabéticos, diminuiu os níveis sanguíneos de glicose e triglicerídeos, sugerindo que o probiótico *B. cereus Toyoi* desempenha atividade antioxidante, sendo capaz de proteger animais diabéticos contra o estresse oxidativo.

Foi relatado também que as bactérias ácido-lácticas são capazes de diminuir o dano tóxico aos hepatócitos causados pelo tert-butil-hidroperóxido. Esse efeito protetor deve-se à redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e pela reativação de enzimas antioxidantes (Ou et al., 2012).

### **3.6 *Pichia pastoris***

Leveduras são micro-organismos eucarióticos que tem sido empregados na produção eficiente de grande número de produtos e processos a partir de substratos de custo reduzido (Storch, 2008). Há relatos de que as leveduras do

gênero *Saccharomyces* são utilizadas como probióticos em humanos e animais a algum tempo (Gil de los Santos et al., 2012). Contudo, existem poucos registros do uso de leveduras do gênero *Pichia* com a mesma finalidade.

*P. pastoris* é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que pode ser utilizada em larga escala na produção de proteínas recombinantes devido a sua grande versatilidade (Storch, 2008; Dummer et al., 2009 a; Dummer et al., 2009 b; Nizoli et al., 2009; Klafke et al., 2016; Siedler et al., 2017), e que também se distingue pela sua disponibilidade em crescer a partir de resíduos de baixo custo (inclusive rejeitos e efluentes industriais) e meios de cultura relativamente simples (Çelik et al. 2008; Gil de Los Santos et. al. 2012), possibilitando ampla produção em escala industrial. Em estudos comparativos, a levedura demonstrou superar outros sistemas de fermentação em termos de rendimento e atividade de proteínas recombinantes (Mack, 2009; Tran, 2017), motivo pelo qual alguns pesquisadores demonstraram interesse em avaliá-la como probiótico na produção animal (Storch, 2008; Gil de Los Santos et. al. 2012; Gaboardi et. al., 2016).

Gil de Los Santos et al. (2012), ao testarem as propriedades probióticas de *P. pastoris* e de *P. pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens* sobre a estimulação do sistema imune e eficácia alimentar em frangos de corte contra a  $\alpha$  toxina de *C. perfringens*, obtiveram resultados positivos em relação ao ganho de peso dos animais que receberam a levedura, em ambas as formas, pois estes apresentaram ganho de peso superior ao grupo controle e a conversão alimentar dos grupos que receberam um dos tipos de *P. pastoris* também foi melhor do que os índices obtidos no grupo controle. Além disso, os animais alimentados com *P. pastoris* selvagem e recombinante também apresentaram melhora na soroconversão e não exibiram alterações histopatológicas significativas. Um outro estudo avaliou o desempenho, a mortalidade e a uniformidade de larvas de jundiá alimentadas com ração suplementada com concentração de  $10^9$  UFC/g de diferentes probióticos (*B. cereus* Toyoi, *S. boulardii* e *P. pastoris*), concluindo que no grupo alimentado com *B. cereus* Toyoi, observou-se maior peso uniforme, comprimento total e comprimento total uniforme (Pinto et al., 2015).

França et. al. (2015) ao desafiarem camundongos Balb/c, suplementados com  $10^7$  UFC/g de *P. pastoris* contra *Salmonella Typhimurium*, encontraram potencial efeito antimicrobiano, indicando que esta levedura além de se apresentar de fácil manipulação genética, se oferece como um portador de moléculas biofuncionais em alimentos para mamíferos, pois apresentou efeito protetor aos animais. Ainda segundo França et al. (2015), em condições gástricas e intestinais simuladas, a taxa de sobrevivência de *P. pastoris* é de 76,8%, quantidade suficiente para assegurar seus benefícios, fato este que torna *P. pastoris* capaz de resistir à passagem pelo TGI.

No ensaio experimental realizado para analisar a sobrevivência dos animais infectados por este patógeno, França et. al. (2015) observaram que os animais suplementados com *P. pastoris* através de gavagem demonstraram uma taxa significativamente maior de sobrevivência quando comparado ao grupo controle (50% e 20% respectivamente). Em contrapartida, no estudo em que *P. pastoris* foi adicionada à ração nas mesmas concentrações, a taxa de sobrevivência encontrada foi de 80%, valor também significativamente maior que a do grupo controle, que obteve sobrevivência de 50%. Logo, destaca-se que os efeitos dos probióticos são dose-dependente, conforme a cepa administrada e dependem da via de administração e/ou do estresse da via utilizada.

Em outro estudo, Cunha (2016) no intuito de confirmar a segurança da utilização de *P. pastoris* em camundongos Swiss machos imunossuprimidos com CF, avaliou a variação de peso, leucograma e estresse oxidativo através da determinação de níveis de TBARS, concluindo que a levedura não atuou como micro-organismo oportunista e tampouco causou óbitos nos animais suplementados. Observou-se ainda que houve efeito protetor à toxicidade causada pela aplicação do quimioterápico nos rins e fígado através da redução das lesões histopatológicas; estímulo significativo ao ganho de peso; expressiva proteção contra a leucopenia e neutropenia decorrentes da administração deste fármaco, uma vez que este foi capaz de aumentar significativamente o número de células do sistema imune dos animais submetidos ao tratamento quimioterápico; e redução dos níveis de TBARS no rim e cérebro dos animais tratados com CF e no fígado e cérebro de animais saudáveis.

Contudo, apesar dos estudos realizados com *P. pastoris* demonstrarem efeitos benéficos e potencial probiótico, as implicações desta levedura ainda

foram pouco exploradas, principalmente ao que se refere a modelos experimentais de imunossupressão induzidos por quimioterapia com CF, o que justifica um estudo adicional a fim de avaliar o comportamento sobre outros parâmetros bioquímicos como hemograma completo, glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia e sobre parâmetros de estresse oxidativo.

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre perfil sanguíneo, parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e desempenho alimentar em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*.

### 4.2 Objetivos específicos

Confirmar a segurança da utilização da levedura *P. pastoris* em camundongos *Swiss* saudáveis e imunossuprimidos por CF (250 mg/kg), através da avaliação da ocorrência de mortes e da análise histopatológica do fígado e rins dos animais;

Avaliar o efeito probiótico de *P. pastoris* em camundongos *Swiss* saudáveis e imunossuprimidos por CF (250 mg/kg) sobre:

- Peso, ingestão e desempenho alimentar;
- Hemograma completo;
- Parâmetros bioquímicos (ureia, colesterol total, triglicerídeos e glicose);
- Peroxidação lipídica no fígado, cérebro e rins, através da determinação dos níveis de TBARS;
- Atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) no fígado, cérebro e rins;
- Presença ou ausência de lesão hepática e renal através da análise histopatológica dos órgãos.



## 5. Hipóteses

- Os animais imunossuprimidos que receberem o probiótico *P. pastoris* apresentarão maior ingestão alimentar e conseqüentemente menor perda de peso ou maior ganho de peso do que os animais imunossuprimidos não suplementados;
- Os animais que receberem o probiótico *P. pastoris* apresentarão melhores parâmetros bioquímicos (menor redução das contagens de células do hemograma completo e melhores níveis de ureia, colesterol total, triglicérides e glicose) do que os animais imunossuprimidos não suplementados;
- O probiótico *P. pastoris* reduzirá a peroxidação lipídica no fígado, cérebro e rins dos animais suplementados em relação aos animais imunossuprimidos não suplementados;
- O probiótico *P. pastoris* aumentará a expressão da enzima antioxidante CAT e no fígado, cérebro e rins dos animais suplementados em relação aos animais imunossuprimidos não suplementados;
- Os animais que receberem *P. pastoris* não apresentarão lesões hepáticas e/ou renais ou apresentarão menos lesões ou lesões mais leves do que os animais imunossuprimidos não suplementados.

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



**Projeto de dissertação**

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
CAMUNDONGOS *Swiss* COM IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA POR  
CICLOFOSFAMIDA E SUPLEMENTADOS COM *Pichia pastoris***

**Khadija Bezerra Massaut**

**Pelotas, 2017**

**KHADIJA BEZERRA MASSAUT**

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM  
CAMUNDONGOS *Swiss* COM IMUNOSSUPRESSÃO INDUZIDA POR  
CICLOFOSFAMIDA E SUPLEMENTADOS COM *Pichia pastoris***

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

Orientador: Ângela Nunes Moreira

Co-orientadores: Fabrício Rochedo Conceição

Renata Torres Abib

**Pelotas, 2017**

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. Toyoi</i>	<i>Bacillus cereus</i> variedade Toyoi
<i>C. perfringes</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CAT	Catalase
CF	Ciclofosfamida
COBEA	Conselho Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FAO	Food and agriculture organization
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IgA	Imunoglobulina A
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDA	Malondealdeído
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
Pp	<i>Pichia pastoris</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TGI	Trato gastro intestinal
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
YM	Yeast Malt Broth

## 1. Introdução

O câncer é uma enfermidade que se caracteriza pelo crescimento desordenado de células malignas que podem invadir tecidos e órgãos adjacentes e/ou espalhar-se para outras regiões do corpo (BRASIL, 2013).

Estima-se que cerca de 8 milhões de pessoas morrem desta doença anualmente (INCA, 2012). De acordo com o INCA – Instituto Nacional do Câncer (2015a), a estimativa brasileira para a incidência de novos diagnósticos de câncer para o biênio 2016-2017 é de cerca de 600 mil casos, um resultado direto das vastas transformações globais das últimas décadas, que induziram a situação de saúde dos povos pela urbanização acelerada, novos modos de vida e novos padrões de consumo (INCA, 2012; BRASIL 2006).

O tratamento pode ser realizado através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea ou hormonioterapia. Sua administração pode ser efetuada isoladamente ou, em muitos casos, se faz necessário combinar mais de uma modalidade (INCA, 2017; ONCOGUIA, 2017).

A abordagem sistêmica da quimioterapia, tratamento que utiliza medicação antineoplásica, permite o combate ao câncer através da destruição, controle ou inibição das células cancerígenas no indivíduo, tornando possível a cura de alguns tumores, e permite o tratamento precoce de metástases não detectáveis (RODRIGUES & POLIDORI, 2012; INCA, 2017; ONCOGUIA 2017). Contudo, os agentes quimioterápicos afetam as células com alta capacidade de replicação – tumoral e não tumoral – o que explica o frequente aparecimento de sintomas digestivos em pacientes sob quimioterapia. Os efeitos colaterais dependem da dose e variam de acordo com a substância administrada. Podem ser agudos ou crônicos e seu efeito tóxico pode surgir de forma precoce, imediata, tardia ou ultra-tardia (CALIXTO-LIMA et al., 2012; INCA, 2015b; INCA, 2017).

Comumente utilizada no tratamento contra o câncer, a ciclofosfamida (CF) é o agente antineoplásico do tipo alquilante de maior potência nas terapias imunossupressoras disponíveis, que impede a divisão celular e inibe a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) (UPTODATE, 2017). A CF é um pró-fármaco,

metabolizado no fígado e excretado pelos rins, que pode ser administrado por via oral ou intravenosa (MCCUNE et al., 2017; WAITZBERG, 2006). Sua metabolização forma dois compostos, a fosfaramida e a acroleína, sendo a primeira responsável pelo efeito citotóxico desta (EMADI et al., 2009). Também é utilizada como agente imunossupressor no transplante de órgãos e no tratamento do lúpus eritematoso sistêmico, sendo também utilizada para outras doenças benignas (CETIK et al., 2015).

Apesar de muito eficaz, sua utilização é limitada devido ao seu alto potencial tóxico secundário, tanto no curto quanto no longo prazo (mesmo após a interrupção da administração) (MCCUNE et al., 2017). O tratamento com CF pode comprometer a função de células do sistema imune, como os leucócitos (SALVA et al., 2014), afetando a capacidade de migração dos neutrófilos (MENDONÇA et al., 2006); induzir o aumento de marcadores de estresse oxidativo e o nível de citocinas (FABER et al., 2011); aumentar a permeabilidade intestinal (YANG et al., 2013) e gerar hepatotoxicidade (WAITZBERG, 2006). Além disso, a administração dessa medicação acarreta outros efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, alopecia, dermatite, amenorréia, oligospermia, esterilidade, pneumonite, cistite hemorrágica e cardiotoxicidade (SANTOS et al., 2007; UPTODATE, 2017; MCCUNE et al., 2017). Por tais motivos, pacientes submetidos a tratamento quimioterápico com CF devem ser monitorados quanto à função hepática, renal e da medula óssea com regularidade (WAITZBERG, 2006).

Objetivando uma melhora nos efeitos colaterais resultantes do tratamento fármaco e na qualidade de vida da população em geral, os profissionais da área da saúde têm voltado sua atenção cada vez mais para os efeitos benéficos proporcionados pelos alimentos ditos funcionais (FAO, 2006).

Alimentos funcionais podem ser classificados conforme o alimento/ingrediente em si ou de acordo com os componentes bioativos nele presente como probióticos, fibras e fitoquímicos, dentre outros (SAAD et al. 2011). Estes alimentos são dotados de propriedades relativas ao desempenho de funções nutricionais básicas e à produção de efeitos metabólicos, fisiológicos

e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ainda serem seguros para o consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999a; ANVISA, 1999b; BALLUS et al., 2010).

De acordo com JANKOVIC et al. (2010), pesquisas relacionadas à probióticos – microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002; FAO, 2006) – tem-se mostrado uma valiosa fonte de dados quanto às vantagens de suas aplicações, uma vez que podem desempenhar papel expressivo no sistema imunológico, digestivo e nas funções respiratórias; contribuir significativamente para aliviar doenças infecciosas em crianças e em populações saudáveis; e ser utilizados como meio para evitar determinadas patologias, através da modulação do sistema imune (FAO, 2006), papel este também desempenhado em animais conforme relatado por SAAD et. al. (2006), inclusive quando imunocomprometidos pelo uso de CF (SALVA et al., 2014).

Salva et al. (2014), ao analisar a influência de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos Swiss imunocomprometidos pela aplicação de CF, observou valores de leucócitos e neutrófilos positivamente maiores nos grupos tratados com *Lactobacillus*. No entanto, outro estudo com camundongos BALB/c concluiu que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não causou efeito na modulação da imunossupressão induzida pelo mesmo fármaco (BUJALANCE et al., 2007).

Entre os probióticos comumente usados em humanos e animais estão algumas espécies de bactérias produtoras de ácido do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. As leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* mostram-se particularmente promissoras, pois possuem vantagem em relação às bactérias, por não serem inibidas por antibacterianos (MARTINS et al., 2005).

*Pichia pastoris* (*P. pastoris*) é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que pode ser utilizada na produção de proteínas recombinantes em larga escala (STORCH, 2008; STORCH, 2008; DUMMER et al., 2009 a; DUMMER et al., 2009 b; NIZOLI et al., 2009; KLAFKE et al., 2016; SIEDLER et al., 2017). Também se distingue pela sua capacidade de crescimento a partir de resíduos de baixo custo e meios de cultura

relativamente simples, possibilitando sua produção em larga escala industrial (CREGG, 2017).

Estudos prévios, realizados na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), tem avaliado o potencial probiótico de *P. pastoris*. Gil de Los Santos et al. (2012) observaram que *P. pastoris* e sua variante recombinante melhoraram a conversão alimentar e aumentaram significativamente o ganho de peso e a soroconversão contra *C. perfringens* de frangos de corte, sem causar alterações histopatológicas significativas. França et. al. (2015) encontraram potencial efeito antimicrobiano de *P. pastoris* ao desafiarem camundongos Balb/c suplementados com a levedura contra *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) e observarem proteção, indicando que esta levedura além de possuir facilidade de manipulação genética, apresenta-se como um portador de moléculas biofuncionais em alimentos para animais. Além disso, concluíram que esta levedura é inócua, e é capaz de resistir à passagem através do trato gastrointestinal (TGI) de mamíferos e de inibir o crescimento de *S. Typhimurium in vitro*. E no intuito de explorar mais os potenciais efeitos probióticos desta levedura, Cunha (2016) realizou estudos adicionais avaliando a variação de peso, as contagens de leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos, a peroxidação lipídica avaliada por TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) e a segurança da utilização de *P. pastoris* em camundongos Swiss imunossuprimidos. A levedura possuiu efeito protetor à hepatotoxicidade causada pela aplicação da CF, estimulou o ganho de peso, protegeu os animais da leucopenia e neutropenia decorrentes da administração deste fármaco, uma vez que foi capaz de aumentar significativamente o número de células dos animais saudáveis e submetidos ao tratamento quimioterápico, e reduziu os níveis de TBARS no rim e cérebro dos animais tratados com CF e no fígado e cérebro de animais saudáveis.

Entretanto, embora *P. pastoris* apresente benefícios comprovados e efeitos potenciais em camundongos Swiss submetidos à quimioterapia com CF, as implicações desta levedura em modelos de imunossupressão sobre outros parâmetros bioquímicos como o hemograma completo, colesterol total e HDL, triglicerídeos, glicose, enzimas sinalizadoras das funções hepática e renal, bem como sobre outros parâmetros de estresse oxidativo ainda necessitam de



maiores investigações. Além disso, no estudo de Cunha (2016) os resultados referentes ao leucograma foram avaliados somente comparando as contagens após a imunossupressão, não sendo avaliada a redução das contagens das células entre o início do experimento e após a imunossupressão. Assim, o presente estudo tem por objetivo dar continuidade aos achados encontrados no estudo de Cunha (2016), avaliando o efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre outros parâmetros bioquímicos (entre eles sobre a redução das contagens das células do hemograma completo) e de estresse oxidativo em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos Swiss.

## 2. Referencial teórico

### 2.1 Probióticos e seu efeito modulador

A microbiota intestinal de seres humanos quando saudável e microbiologicamente equilibrada acarreta em um desempenho normal das funções fisiológicas, uma vez que participa do metabolismo dos produtos alimentares, provê fatores essenciais de crescimento, protege contra infecções por micro-organismos altamente virulentos e estimula o sistema imunológico (TORTORA et al., 2005; SAAD et al., 2006; SANTOS & VARAVALLO, 2011). Suas bactérias reforçam constantemente as diversas linhas de defesa do intestino através de mecanismos como a exclusão imunológica e a regulação e eliminação de caráter imune, que permitem o estabelecimento desta convivência dinâmica entre os seres humanos e os micro-organismos (COSTA & VARAVALLO, 2011 *apud* MAJAMAA & ISOLAURI, 1997) assegurando assim, uma melhoria na qualidade de vida.

Espécies de bifidobactérias e lactobacilos (bactérias que constituem o microbioma humano) degradam substâncias não-absorvíveis pelo hospedeiro, sendo capazes de promover benefícios para o mesmo. Esses tipos de bactérias podem ser administrados em doses controladas, incluídas geralmente em bebidas lácteas fermentadas, comprimidos ou pós. A esses microrganismos confere-se genericamente a denominação de probióticos (CUPPARI, 2002; TORTORA et al., 2005).

Segundo a ANVISA (2002), probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo quando ingeridos em doses adequadas.

Jankovic et al., (2010) relataram que estudos referentes a probióticos tem demonstrado inúmeros dados positivos sobre os benefícios de sua utilização, uma vez que podem desempenhar papel significativo no sistema imunológico, reduzir a incidência, duração e seriedade de patologias digestivas e intestinais (CUPPARI, 2002), intervir de maneira positiva nas funções respiratórias, e em populações saudáveis, pode ser utilizado como veículo para evitar determinadas enfermidades, modulando o sistema imune (FAO, 2006), papel este que também

pôde ser observado em estudos com animais conforme descrito por SAAD et. al. (2006), inclusive quando imunocomprometidos pelo uso de CF (BUJALANCE et al., 2007; SALVA et al., 2014).

Entre os probióticos usados com maior frequência em humanos e animais, encontram-se algumas espécies de bactérias produtoras de ácido do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Segundo VANDEREHOOF (2008), os benefícios dos probióticos são estirpe específicos, e resultados benéficos produzidos por algumas estirpes já foram evidenciados em ensaios clínicos, contudo, é necessário lembrar que nem todas as cepas que possuem eficácia comprovada são adequadas para uso em todas as indicações (BADARÓ et al. 2008).

Diversos estudos têm relatado não só a capacidade de regular a microbiota intestinal, mas também o potencial modulador do sistema imune proporcionado pela administração de probióticos (CASTELLI, 2011; COSTA & VARAVALLLO, 2011; CARREIRO, 2013; SALVA et al., 2014).

*Lactobacillus* têm sido amplamente utilizados em estudos experimentais que relacionam probióticos com a resposta imune (BUJALANCE et al, 2007; LIBOREDO et al, 2010; SALVA et al, 2014), além de espécies de *Bifidobacterium* e da levedura *Saccharomyces boulardii*.

As leveduras do gênero *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* mostram-se particularmente promissoras, pois possuem vantagens em relação às bactérias, não sendo inibidas por antibacterianos e possuindo a capacidade de serem eliminadas rapidamente após a interrupção da terapia (BLEHAUT et al., 1989; BODDY et al., 1991).

Em um estudo para avaliar o sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi* sobre a imunomodulação em camundongos, CASTELLI (2011) observou que os marcadores de imunidade humoral apresentaram níveis significativamente superiores quando os micro-organismos foram administrados concomitantemente, quando comparados ao grupo controle e na sua forma isolada.

## 2.2 Efeito dos probióticos sobre a imunossupressão

De acordo com Zuluaga et al. (2006), em camundongos albinos Swiss, a administração da CF é capaz de reduzir as células do sistema imune após uma dosagem de 250 mg.kg<sup>-1</sup>, ocasionando uma neutropenia severa, assim como uma redução de 92 e 96% de linfócitos e monócitos, respectivamente.

Outros estudos realizados com ratos demonstraram que a CF induz ao estresse oxidativo através do aumento da peroxidação lipídica e da redução da atividade de várias enzimas antioxidantes (TRIPATHI & JENA, 2010; ABRAHAM & RABI, 2011). Rehman et al. (2012) observaram que camundongos Swiss submetidos a tratamento com CF demonstraram maiores níveis de nitrogênio uréico no sangue e creatinina, quando comparados ao grupo controle.

Salva et al. (2014), ao analisarem o efeito de probióticos sobre a modulação do sistema imune de camundongos Swiss sob imunossupressão pela aplicação de CF, observaram maiores valores de leucócitos e neutrófilos nos grupos tratados com *Lactobacillus*. Contudo, outro estudo, com camundongos BALB/c, verificou que o probiótico *Lactobacillus plantarum* não causou efeito na modulação da imunossupressão induzida por este fármaco (BUJALANCE et al., 2007).

Amaretti et al., (2013), ao avaliarem o potencial antioxidante de diversas cepas de bactérias ácido-lácticas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcuse* *Streptococcus thermophilus*) utilizadas concomitantemente, puderam observar um efeito na redução do estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico doxorrubicina. Em relação ao efeito do probiótico *B. Toyoi* sobre os parâmetros de estresse oxidativo em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina, Bampi (2015) relatou que o nível do marcador de estresse oxidativo TBARS foi menor no grupo suplementado com *B. Toyoi*. Além disso, observou-se também que este micro-organismo, em camundongos diabéticos, diminuiu os níveis sanguíneos de glicose e triglicerídeos, sugerindo que o probiótico *B. Toyoi* desempenha atividade antioxidante, sendo capaz de proteger animais diabéticos contra o estresse oxidativo.

Foi relatado também que as bactérias ácido-lácticas são capazes de diminuir o dano tóxico aos hepatócitos causados pelo tert-butil-hidroperóxido.

Esse efeito protetor deve-se à redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e pela reativação de enzimas antioxidantes (OU et al., 2012).

Em um experimento realizado por LIBOREDO et al., (2010), constatou-se que houve menor mortalidade nos animais tratados com bifidobactérias (30%), seguido do grupo com suplementação de lactobacilos (40%), sendo o índice maior no grupo cuja combinação destes micro-organismos foi distribuída (60%), ocorrendo principalmente 48h a 72h após a primeira aplicação do fármaco 1,2-dimethylhydrazine (DMH).

Um outro estudo avaliou o desempenho, a mortalidade e a uniformidade de larvas de jundiá alimentadas com ração suplementada com concentração de  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup> de diferentes probióticos (*B. Toyoi*, *S. boulardii* e *P. pastoris*), concluindo que no grupo alimentado com *B. Toyoi*, observou-se maior peso uniforme, comprimento total e comprimento total uniforme (Pinto et al., 2015).

### **2.3 *Pichia pastoris***

Leveduras são micro-organismos eucarióticos que tem sido empregados na produção eficiente de grande número de produtos e processos a partir de substratos de custo reduzido (STORCH, 2008). Há relatos de que as leveduras do gênero *Saccharomyces* são utilizadas como probióticos em humanos e animais a algum tempo (Gil de los Santos et al., 2012). Contudo, existem poucos registros do uso de leveduras do gênero *Pichia* com a mesma finalidade.

*P. pastoris* é uma levedura da família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia*, que pode ser utilizada em larga escala na produção de proteínas recombinantes devido a sua grande versatilidade (STORCH, 2008; DUMMER et al., 2009 a; DUMMER et al., 2009 b; NIZOLI et al., 2009; KLAFKE et al., 2016; SIEDLER et al., 2017), e que também se distingue pela sua disponibilidade em crescer a partir de resíduos de baixo custo (inclusive rejeitos e efluentes industriais) e meios de cultura relativamente simples (ÇELIK et al. 2008; GIL DE LOS SANTOS et. al. 2012), possibilitando ampla produção em escala industrial. Em estudos comparativos, a levedura demonstrou superar outros sistemas de fermentação em termos de rendimento e atividade de proteínas recombinantes (MACK, 2009; TRAN, 2017), motivo pelo qual alguns pesquisadores

demonstraram interesse em avaliá-la como probiótico na produção animal (STORCH, 2008; GIL DE LOS SANTOS et. al. 2012; GABOARDI et. al., 2016).

Gil de los Santos et al., (2012), ao testar as propriedades probióticas de *P. pastoris* e de *P. pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *C. perfringens* sobre a estimulação do sistema imune e eficácia alimentar em frangos de corte contra a  $\alpha$  toxina de *C. perfringens*, obtiveram resultados positivos em relação ao ganho de peso dos animais que receberam a levedura, em ambas as formas, pois estes apresentaram ganho de peso superior ao grupo controle e a conversão alimentar dos grupos que receberam um dos tipos de *P. pastoris* também foi melhor do que os índices obtidos no grupo controle. Além disso, os animais alimentados com *P. pastoris* selvagem e recombinante também apresentaram melhora na soroconversão e não exibiram alterações histopatológicas significativas.

França et. al. (2015) ao desafiar camundongos Balb/c, suplementados com  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> de *P. pastoris* contra *S. Typhimurium*, encontraram potencial efeito antimicrobiano, indicando que esta levedura além de apresentar-se de fácil manipulação genética, se oferece como um portador de moléculas biofuncionais em alimentos para mamíferos, pois apresentou efeito protetor aos animais. Ainda segundo França et al. (2015), em condições gástricas e intestinais simuladas, a taxa de sobrevivência de *P. pastoris* é de 76,8%, quantidade suficiente para assegurar seus benefícios, fato este que torna *P. pastoris* capaz de resistir à passagem pelo TGI.

No ensaio experimental realizado para analisar a sobrevivência dos animais infectados por este patógeno, França et. al. (2015) observaram que os animais suplementados com *P. pastoris* através de gavagem demonstraram uma taxa significativamente maior de sobrevivência quando comparado ao grupo controle (50% e 20% respectivamente). Em contrapartida, no estudo em que *P. pastoris* foi adicionada à ração nas mesmas concentrações, a taxa de sobrevivência encontrada foi de 80%, valor também significativamente maior que a do grupo controle, que obteve sobrevivência de 50%. Logo, destaca-se que os efeitos dos probióticos são dose-dependente, conforme a cepa administrada e dependem da via de administração e/ou do estresse da via utilizada.

Em outro estudo preliminar, Cunha (2016), no intuito de confirmar a segurança da utilização de *P. pastoris* em camundongos *Swiss* machos imunossuprimidos com CF, avaliou a variação de peso, leucograma e estresse oxidativo através da determinação de níveis de TBARS, concluindo que a levedura não atuou como micro-organismo oportunista e tampouco causou óbitos nos animais suplementados. Observou-se ainda que houve efeito protetor à toxicidade causada pela aplicação do quimioterápico nos rins e fígado através da redução das lesões histopatológicas; estímulo significativo ao ganho de peso; expressiva proteção contra a leucopenia e neutropenia decorrentes da administração deste fármaco, uma vez que este foi capaz de aumentar significativamente o número de células do sistema imune dos animais submetidos ao tratamento quimioterápico; e redução dos níveis de TBARS no rim e cérebro dos animais tratados com CF e no fígado e cérebro de animais saudáveis.

Contudo, apesar dos estudos realizados com *P. pastoris* demonstrarem efeitos benéficos e potencial probiótico, as implicações desta levedura ainda foram pouco exploradas, principalmente ao que se refere a modelos experimentais de imunossupressão induzidos por quimioterapia com CF, o que justifica um estudo adicional a fim de avaliar o comportamento sobre outros parâmetros bioquímicos como hemograma completo, glicose, colesterol total e HDL e triglicerídeos, e sobre parâmetros de estresse oxidativo.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*.

#### 3.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito probiótico de *P. pastoris* em camundongos *Swiss* imunossuprimidos por CF sobre:

- Peso e ingestão alimentar;
- Hemograma completo;
- Parâmetros bioquímicos aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e glicose;
- Peroxidação lipídica no fígado, cérebro e rins, através da determinação dos níveis de TBARS;
- Atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD no fígado, cérebro e rins.
- Presença ou ausência de lesão hepática e renal através da análise histopatológica dos órgãos.



#### 4. Hipóteses

- Os animais imunossuprimidos que receberem o probiótico *P. pastoris* apresentarão maior ingestão alimentar e conseqüentemente menor perda de peso ou maior ganho de peso do que os animais imunossuprimidos não suplementados;
- Os animais que receberem o probiótico *P. pastoris* apresentarão melhores parâmetros bioquímicos (menor redução das contagens de células do hemograma completo e melhores níveis de AST, ALT, uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, glicose e colesterol HDL) do que os animais imunossuprimidos não suplementados;
- O probiótico *P. pastoris* reduzirá a peroxidação lipídica no fígado, cérebro e rins dos animais suplementados;
- O probiótico *P. pastoris* aumentará a expressão das enzimas antioxidantes CAT e SOD no fígado, cérebro e rins dos animais suplementados;
- Os animais que receberem *P. pastoris* não apresentarão lesões hepáticas e/ou renais ou apresentarão menos lesões ou lesões mais leves do que os animais imunossuprimidos não suplementados.

## 5. Revisão de literatura

Foi realizada busca de artigos no Periódicos Capes, que indexa as seguintes bases de dados: Pubmed, Medline, Lilacs, Web of Science, Cochrane, Science Direct, Scopus, Scielo, Google Acadêmico entre outros. Foram pesquisados artigos publicados nos últimos 10 anos, revisados por pares, e não houve outros limites nas buscas. A busca de artigos também foi feita através de checagem de referências dos artigos consultados. Foram utilizadas combinações dos seguintes descritores (DeCS/MeSH): Chemotherapy; Neutropenia; Probiotics; Cyclophosphamide; Biological assay; Animal models; Mouse; Mice; Immunity; Immune system; Neoplasms; Cancer; *Pichia pastoris*; Oxidative stress; Blood count. No Quadro 1 é apresentado o título e autor principal, com o nome da revista e ano de publicação, e o local de realização, delineamento, amostra e principais resultados do estudo, dos 18 trabalhos selecionados na pesquisa bibliográfica.

**Quadro 1:** Principais artigos selecionados na busca bibliográfica.

Nº	Título e Autor/ Revista e ano	Local	Delineamento	Amostra	Principais Resultados
1	<p>Neutropenia induced in outbreed mice by a simplified low dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious disease.</p> <p>Zuluaga, A.F. et al.</p> <p>BMC infectious disease, 2006.</p>	Medellín, Colômbia.	<p>Os animais receberam tratamento com CF na dosagem de 250mg/kg (menor que a usual). Uma dose no 1º dia de 150mg/kg e a outra de 100mg/kg no 4º dia, com o objetivo de induzir a neutropenia.</p> <p>Amostras de sangue dos animais foram coletadas nos dias 1, 4, 5, 6, 7 e 11 para realização de leucograma.</p>	15 camundongos albinos Swiss fêmeas 6 semanas de idade	<p><u>Leucócitos totais:</u> a contagem inicial foi determinada no dia 1 antes da 1ª dose de CF. No 4º dia antes da segunda dosagem houve uma redução de 84% e a leucopenia foi alcançada no 5º dia, 16h após a segunda dose de CF administrada.</p> <p><u>Neutrófilos:</u> no 4º dia, após a segunda dosagem ocorreu neutropenia severa, permanecendo durante os dias 5-6. No dia 11, os níveis já haviam sido normalizados.</p> <p><u>Linfócitos e Monócitos:</u> no 5º dia houve uma redução de 92% e 96% respectivamente, contudo, no dia 7 já havia sinais de recuperação.</p>
2	<p>Avaliação do potencial probiótico da levedura <i>Pichia pastoris</i>.</p> <p>França, R.C.</p> <p>Dissertação de mestrado Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2011.</p>	Pelotas, Brasil.	<p>Foram utilizadas colônias de <i>Pichia pastoris</i> (Pp) cepa X-33.</p> <p>Resistência da Pp ao trato gastrointestinal (TGI) em condições simuladas: foram incubados a 37°C 8log UFC.mL<sup>-1</sup> de Pp para condições gástricas e intestinais isolada e consecutivamente. A taxa de sobrevivência deu-se com base na porcentagem do log de UFC que cresceram sob plaqueamento após a exposição às condições simuladas, em relação às concentrações iniciais da levedura.</p> <p>Resistência e persistência da Pp no TGI de camundongos: os animais receberam uma única dose via oral de</p>	<p>camundongos Balb/c fêmeas 6 semanas de idade</p> <p>camundongos Balb/c machos 6 semanas de idade</p> <p>camundongos Balb/c fêmeas 6 – 8</p>	<p><u>Resistência à simulação gástrica:</u> demonstrou capacidade de resistência à ação do baixo pH do suco gástrico e pepsina com porcentagem de sobrevivência à exposição de 80,5%.</p> <p><u>Resistência à simulação intestinal:</u> demonstrou tolerância satisfatória à exposição aos sais biliares, pancreatina e pH alcalino encontrado no ambiente intestinal com porcentagem de sobrevivência de 92,7%.</p> <p><u>Resistência à simulação do TGI:</u> demonstrou resistência às condições gástricas e intestinais simuladas consecutivamente em número suficiente para exercer um efeito benéfico <i>in situ</i> com porcentagem de sobrevivência de 76,8%.</p> <p><u>Resistência ao TGI em camundongos:</u> demonstrou elevada sobrevivência após 24h da administração com 6,9x10<sup>6</sup> UFC.g<sup>-1</sup> de fezes frescas. Para 48h, a contagem</p>

		<p>gavagem contendo <math>7,17 \log</math> UFC. Fezes foram coletadas 24, 28 e 72h após a administração da levedura e contagens de UFC totais por grama de fezes frescas foram determinadas por plaqueamento das diluições seriadas.</p> <p>Ocorrência de disseminação e segurança da utilização de Pp como probiótico: após a eutanásia foram analisados cortes histopatológicos de amostras de baço, fígado e intestino dos animais.</p> <p>Resistência da levedura em solução sob refrigeração: foram feitas incubações do microrganismo em solução salina 0,9% e solução salina tamponada fosfatada (PBS). Ambas soluções foram armazenadas à 4°C por até 70 dias e foram diluições e contagens seriadas a cada 48h nos primeiros 30 dias e a cada 7 dias nos demais. A taxa de sobrevivência deu-se com base na porcentagem do log de UFC que cresceram sob plaqueamento após o armazenamento, em relação às concentrações iniciais da levedura.</p> <p>Resistência da levedura ao TGI de camundongos após 70 dias de armazenamento: o teste foi repetido com administração de gavagem das duas soluções aos animais.</p> <p>Efeito inibitório de Pp sobre o crescimento de <i>S. typhimurium</i> e <i>E. coli</i> em meios de cultura: foram incubadas</p>	<p>semanas de idade</p> <p>27 camundongos Balb/c 7 semanas de idade (grupo tratamento)</p> <p>camundongos Balb/c (grupo controle)</p>	<p>foi de <math>7,5 \times 10^2</math> UFC.g<sup>-1</sup> e para 72h não houve crescimento. Confirmando a capacidade de resistência, chegando viável, metabolicamente ativa e em quantidades adequadas ao ecossistema onde sua ação é esperada nas primeiras 24h. Conclui-se que se faz necessária a administração da levedura a cada 24h a fim de manter as quantidades adequadas no hospedeiro.</p> <p><u>Histopatologia:</u> a análise dos órgãos confirmou que não houve lesões nos mesmos bem como, não ocorreram alterações morfológicas ou presença da levedura no seu parênquima. As microvilosidades intestinais não apresentaram modificações em comparação ao grupo controle.</p> <p><u>Resistência à refrigeração:</u> as contagens de Pp se mantiveram estáveis durante todo o período, apresentando uma taxa de sobrevivência de 100% após 70 dias sob refrigeração em ambas soluções. Sugerindo que a levedura apresenta uma elevada resistência ao armazenamento em solução sob refrigeração.</p> <p><u>Resistência ao TGI após 70 dias de refrigeração:</u> apresentou elevada sobrevivência 24h após sua administração com contagens de 8,23 log (para solução salina) e <math>9,53 \log</math> UFC.g<sup>-1</sup> (PBS) de fezes frescas. Sugerindo que a levedura apresenta elevada resistência ao TGI de camundongos mesmo após 70 dias de armazenamento.</p> <p><u>Efeito inibitório:</u> Pp inibiu o crescimento de ambos patógenos nos dois meios de cultura após 24h de incubação. Houve redução de <i>E. coli</i> co-cultivada com Pp em aproximadamente 86 (LB) e 67% (YPD) e 50% da população de <i>S. typhimurium</i> em ambos os caldos. Para tempo de geração, <i>S. typhimurium</i> apresentou aumento no mesmo quando co-cultivada com a levedura (150%) porém</p>
--	--	--	---	---

			<p>106 cepas de cada patógeno e após 0, 4, 8 e 24h alíquotas foram coletadas e plaqueadas para determinação do número de células viáveis.</p> <p>Efeito de Pp sobre a sobrevivência de camundongos infectados <i>S. Typhimurium</i>: os animais foram divididos em grupos de 4 e inoculados via oral com diluições de 10<sup>1</sup> a 10<sup>6</sup> células. Para avaliação, o Grupo Tratamento recebeu doses diárias por gavagem de 1.108 UFC.mL<sup>-1</sup> de Pp e o Grupo Controle recebeu solução salina 0,9% por 20 dias. No 10<sup>o</sup> dia após o início da levedura, os animais foram desafiados por gavagem com 10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de <i>S. Typhimurium</i> e monitorados diariamente quanto à sintomatologia e à ocorrência de morte.</p>		<p>a <i>E. coli</i> demonstrou maior sensibilidade, com aumento de 208% do que em um cultivo isolado.</p> <p><u>Efeito sobre a sobrevivência à <i>S. Typhimurium</i></u>: o grupo tratamento apresentou maior sobrevivência (56%) 10 dias após o desafio oral do que o grupo controle (48%). Porém, a diferença não foi significativa (p 0,08).</p>
3	<p><i>Pichia pastoris</i> X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against <i>Salmonella Typhimurium</i>.</p> <p>França, R.C. et al.</p> <p>Appl Microbiol Biotechnological, 2015.</p>	<p>Pelotas, Brasil.</p>	<p>Ração: adicionados 7 logUFC.g<sup>-1</sup> de Pp X-33 ou <i>S. boulardii</i> (controle) na ração armazenadas sob refrigeração 4°C até o uso, com quantificação de UFC na mesma a cada 7 dias para analisar sua viabilidade.</p> <p>Resistência Pp em condições gastrointestinais simuladas: foram incubados a 37°C 8log UFC.mL<sup>-1</sup> de Pp para condições gástricas e intestinais consecutivamente. A taxa de sobrevivência deu-se com base na porcentagem do log de UFC que cresceram sob plaqueamento após a exposição às condições simuladas, em</p>	<p>1<sup>o</sup>) 45 camundongos Balb/c machos 6 – 8 semanas de idade</p> <p>2<sup>o</sup>) 30 camundongos Balb/c machos 6 – 8 semanas de idade</p>	<p><u>Estabilidade da ração</u>: concentração de células permaneceu viável e estável por 2 meses (7log UFC.g<sup>-1</sup>).</p> <p><u>Resistência para condições in vitro e in vivo</u>: Pp sobreviveu às condições do TGI simulado para efeito benéfico in situ com taxas de sobrevivência à exposição de 76,8%. In vivo, também sobreviveu apresentando 6,84log UFC.g<sup>-1</sup> em fezes frescas em 24h após o tratamento e 2,87log UFC.g<sup>-1</sup> em 48h (zero contagem em 72h).</p> <p><u>Segurança</u>: não foram observadas alterações comportamentais nos animais, lesões na análise histopatológica ou alterações nas microvilosidades.</p> <p><u>Inibição de crescimento</u>: a Pp promoveu a inibição da <i>S. typhi</i> após 24h de incubação em 46% da população em caldo LB e 86% no YPD quando co-cultivadas com a</p>

		<p>relação às concentrações iniciais da levedura.</p> <p>Resistência e persistência de Pp no TGI de camundongos: foi administrada uma dose oral de 7log UFC para os animais e as fezes foram coletadas após 24, 48 e 72h e as contagens foram determinadas por fezes em Agar YPD. Os animais que não receberam a Pp foram considerados G. controle.</p> <p>Inibição do crescimento de <i>S. typhimurium</i> em meio de cultura com PP: 6log UFC de <i>S. typhi</i> e de Pp foram incubadas em caldo YPD e LB. Considerou-se culturas puras como controle e após 0, 4 e 8h foram determinados o número de células viáveis de cada microrganismo e o tempo de crescimento de <i>S. typhi</i> também foi determinado pela presença ou ausência de Pp.</p> <p>Inibição da adesão de <i>S. typhi</i> às células intestinais HCT-116 pela Pp: <i>S. boulardii</i> foi utilizado como controle positivo e adicionou-se 5log UFC de <i>S. typhi</i> em 3 poços (puro e contendo as leveduras) e incubadas por 1h. Os resultados foram expressos em porcentagem de adesão às células intestinais HCT-116.</p> <p>Ação antibacteriana de Pp <i>in vivo</i>: os ratos foram divididos em grupos de 5, tratados por gavagem com 300µL de cada uma das diluições decimais,</p>	<p>levedura em comparação ao G. controle. O tempo de geração aumentou de 24min para 36min quando na presença de Pp em ambos os caldos.</p> <p><u>Inibição de adesão às células intestinais</u>: o percentual de adesão reduziu para 47% quando incubas em conjunto com a Pp em comparação com bactérias incubadas sozinhas (<math>p &lt; 0,05</math>).</p> <p><u>Ação antibacteriana <i>in vivo</i></u>: a taxa de sobrevivência dos animais com PP por gavagem foi de 50%, significativamente maior que no G. controle (apenas 20%). No experimento com Pp adicionada à ração, a taxa de sobrevivência foi de 80%, significativamente maior que no G. controle (50%). No controle positivo, a taxa foi de 60%. Não foram detectadas células de <i>S. typhi</i> nas fezes coletadas no 13º após o desafio para os animais suplementados com Pp e <i>S. boulardii</i>, para os não suplementados, a taxa foi de 8,78 logUFC.g fezes de <i>S. typhi</i>; No intestino dos animais sobreviventes ao desafio os resultados foram semelhantes aos das fezes. Houveram baixos níveis de <i>S. typhi</i> no intestino dos animais que receberam Pp (0,78 logUFC) e <i>S. boulardii</i> (1,36 logUFC), para os que não receberam suplementação a taxa foi 3,17log UFC. Para os animais sobreviventes com <i>S. typhi</i>, as percentagens também foram significativas com 12,5% para Pp, 33% para <i>S. boulardii</i> e 80% para G. controle. Com relação à translocação bacteriana, nenhuma <i>S. typhi</i> foi detectada nos órgãos dos animais que receberam Pp assim como houve 0% de ocorrência de <i>S. typhi</i> no fígado e baço dos animais com ração rica em Pp. O percentual de sobreviventes com lesões intestinais moderadas e leves quando suplementados com Pp foi significativamente menor (25 e 12,5% respectivamente) do que no G. controle (60 e 40% respectivamente).</p>
--	--	---	---

			<p>contendo de 1 a 6log UFC de <i>S. typhi</i>, monitorados diariamente e os óbitos registrados para determinar DL50. 1º) 15 animais receberam doses diárias via sonda de 1ml solução salina 0,9% com 7 logUFC.g<sup>-1</sup> Pp por 20 dias sendo o G. controle submetido apenas à solução salina. 2º) 10 animais receberam dieta ad libitum com 7log UFC.g<sup>-1</sup> de levedura para o mesmo período. G. controle negativo recebeu apenas ração e G. controle positivo recebeu ração suplementada com 7 log UFC.g<sup>-1</sup> de <i>S. boulardii</i>. No 20º dia 5 animais por grupo do experimento 1 foram sacrificados para avaliar grau de inocuidade através de amostras histopatológicas dos órgãos. Os animais foram observados diariamente quanto ao comportamento apresentado; os demais animais de ambos experimentos foram desafiados por gavagem com DL50 (5log UFC/rato) de <i>S. typhi</i> e 10 dias mais tarde, as taxas de sobrevivência foram calculadas. 13º dia após o desafio fezes frescas foram coletadas e os animais sobreviventes eutanasiados. Através de amostras de fígado, baço e intestino, foi medida a proteção contra infecções, capacidade de colonização (células viáveis/fezes e intestino), translocação bacteriana (log de UFC/órgão e percentual animais/grupo com sintomas patogênicos), presença de lesões, infiltração de leucócitos e presença de folículos isolados</p>		
--	--	--	---	--	--

			(histologia) e presença/ausência de alterações morfológicas nas vilosidades (lesões leves, moderadas, graves).		
4	Impact of probiotic supplementation on mortality of induced 1,2-dimethylhydrazine carcinogenesis in a mouse model.  Liboredo, J.C. et al.  Nutrition 26 (2010) 779–783	Minas Gerais, Brasil.	Experimento 1: os animais foram divididos em 10 grupos, G. 1 Cont; G. 2 Cont/DMH; G. 3 Lacto; G. 4 Lacto/DMH; G. 5 Bifido; G. 6 Bifido/DMH; G. 7 Lacto/Bífido; G. 8 Lacto/Bifido/DMH; G. 9 Sb,; 10 Sb/DMH.  Os probióticos foram iniciados 1 semana antes da injeção de DMH e ofertados ad libitum diariamente na água dos animais na concentração de 10 UFC/MI exceto para Lacto/bífido e Lacto/bífido/DMH que receberam 10 UFC/mL de cada microrganismo. O DMH foi administrado 1x/semana a partir do 7º dia por 6 semanas.  Mortalidade acumulada: cada morte foi registrada durante o estudo.	1º) 100 camundongos Swiss  Translocação 48 camundongos Swiss  2º) 30 camundongos Swiss	<u>Experimento 1:</u>  - <u>Mortalidade:</u> os animais que receberam DMH e foram tratados com Lactobacilo ou bifidobactérias e a combinação destes apresentaram 40%, 30% e 60% de mortalidade, respectivamente, ocorrendo principalmente 48h a 72h após a 1ª DMH. Maior mortalidade foi observada no grupo Lacto/Bifido/DMH quando comparado ao grupo Sb. Nenhum animal no Cont /DMH e Sb DMH morreu.  - <u>Translocação:</u> foi mais frequente nos grupos desafiados com DMH e/ou tratados com probióticos, sendo geralmente maior nos gânglios linfáticos mesentéricos (MLN). Em grupos injetados com DMH (tratados ou não com probióticos); atingiu sempre o fígado e foi mais intensa em camundongos do grupo Lacto e Bifido. Houve diferença significativa para MLN e baço apenas entre Bifido/DMH, Cont, Lacto e Sb; para fígado entre Bifido/DMH, Cont, Lacto, Bífido e Sb ( $p < 0,05$ ).  <u>Experimento 2:</u> a interrupção da administração de probióticos para a 1ª injeção de DMH impediu a morte de camundongos durante o estudo.



			<p>Translocação microbiana: foi determinada para linfonodos mesentéricos, fígado e baço por 8 grupos adicionais exceto Lacto/bívido e Lacto/bívido/DMH no 2º dia após a aplicação de DMH.</p> <p>Experimento 2: os animais foram divididos em 3 grupos:  Grupo 1 Lacto / DMH  Grupo 2 Bívido / DMH  Grupo 3 Lacto /bívido / DMH  No dia da 1ª aplicação de DMH não receberam probiótico e o estudo durou 14 semanas sendo a saúde geral monitorada diariamente.</p>		
5	<p>A probiotic strain of <i>Lactobacillus plantarum</i> stimulate lymphocyte response in immunologically intact and immunocompromised mice.</p> <p>Bujalance, C. et al.</p> <p>International Journal of Food Microbiology, 2007.</p>	Granada, Espanha.	<p>Os camundongos foram divididos em 4 grupos:  Grupo 1 Controle  Grupo 2 <i>L. plantarum</i>  Grupo 3 CF  Grupo 4 <i>L. plantarum</i> + CF</p> <p>Os animais receberam os lactobacilos 10 dias antes da 1ª dose (150mg/kg-dia 0) de CF e outra dose de 100mg/kg no 3º dia.</p>	6 camundongos Balb/c fêmeas 6 – 8 semanas de idade	<p><u>Contagem leucócitos e esplenócitos:</u> Não houve modificação significativa entre os que receberam <i>L. plantarum</i> e o controle. No grupo <i>L. plantarum</i> + CF, esses parâmetros não foram alterados pelos probióticos.</p> <p><u>Restauração do sistema imune:</u> foi estatisticamente significativa no dia 1 e 11 após a última injeção de CF (corresponde ao dia 15 e 25 de tratamento com <i>L. plantarum</i>).</p> <p><u>Suplementação de <i>L. plantarum</i>:</u> apresentou um leve aumento na resposta proliferativa de concanavalin A nos animais com o sistema imune intacto.</p> <p><u>Supressão induzida por CF:</u> o <i>L. plantarum</i> não apresentou efeito na mesma.</p>

6	<p>Performance of jundiá larvae, <i>Rhamdia quelen</i>, fed on probiotic supplemented diets.</p> <p>Pinto, V. B. et al.</p> <p>Acta Scientiarum. Animal Sciences, 2015.</p>	Pelotas, Brasil.	<p>Foi avaliado desempenho, mortalidade e uniformidade de larvas de jundiá alimentadas com ração suplementada com diferentes probióticos (<math>10^9</math> UFC/g ração).</p> <p>As larvas foram divididas em 4 grupos:  G. 1 Controle (CO)  G. 2 <i>Pichia pastoris</i> (PP)  G. 3 <i>Saccharomyces boulardii</i> (SB)  G. 4 <i>Bacillus cereus</i> var <i>toyoi</i> (BT)</p> <p>Peso e comprimento foram medidos com 10 larvas de cada aquário nos dias 7 e 14 (sem reposição ao mesmo) e com 20 larvas no dia 21.</p> <p>Análise: BW – peso corporal; TL – comprimento total; WGP – percentual ganho peso 2 medidas consecutivas; TLGp – percentual ganho total comprimento 2 medidas consecutivas; Fator de condição K; SGRP – taxa crescimento específico 2 medidas consecutivas; M – mortalidade; WU – peso uniforme; TLU – comprimento total uniforme.</p>	1600 larvas de jundiá 4 dias de idade após eclosão	<p><u>Semana 1 (dia 7):</u> as larvas alimentadas com BT apresentaram significativamente maior BW, TL, SGR, WGP e TLGp comparado aos outros probióticos. E peso 25% maior que o grupo CO (apesar de não significativo).</p> <p><u>Semana 2 (dia 14):</u> as larvas alimentadas com BT apresentaram maiores taxas de PV, TL e K quando comparada ao grupo PP e igual aos grupos CO e SB. SGR, WGP e TLGp foram semelhantes entre os tratamentos.</p> <p><u>Semana 3 (dia 21):</u> as larvas alimentadas com BT apresentaram maiores taxas de PV, K e TLU quando comparado aos outros grupos. BT promoveu maior TL entre os probióticos e WU em relação ao grupo controle. A taxa de mortalidade não foi afetada pelos tratamentos.</p>
---	---	------------------	---	--	---

7	<p>Probiotics: viable and inactivated cells on the performance, microflora and blood parameters of piglets.</p> <p>Busanello, M. et al.</p> <p>Rev. Bras. Saúde Prod. Anim., 2015.</p>	Paraná, Brasil.	<p>Os animais foram divididos em 3 grupos: G 1 Controle G 2 Ativo ("pool" <i>L. spp</i> e <i>L. plantarum</i>) G 3 Inativo</p> <p>Coleta de fezes: foram realizadas aos 7, 21 e 35 dias de idade para avaliação da flora de ácido láctico.</p> <p>Do nascimento aos 21 dias (lactação): foi monitorado ganho de peso (GP) e ganho peso diário (GPD).</p> <p>De 21 a 35 dias (creche): foi monitorado DWG, consumo diário de ração (CDR) e conversão alimentar (CA).</p> <p>Análise sanguínea e padrão imunológico: foram coletadas amostras aos 7, 21 e 35 dias de idade.</p>	<p>Lactação 108 leitões</p> <p>Creche 72 leitões</p>	<p><u>Período lactação:</u> não houve diferença significativa entre os tratamentos no GP e GPD dos animais.</p> <p><u>Período creche:</u> não houve diferença significativa entre os tratamentos para peso médio e CA, porém, para consumo de ração, CDR, GP e GPD encontrou-se valores de <math>p &lt; 0,05</math> entre os grupos.</p> <p><u>Coleta de fezes:</u> não houve diferença significativa entre os grupos para análise de contagem de coliformes e bactérias ácido lácticas.</p> <p><u>Exame sangue:</u> não houve diferença significativa entre os grupos para proteína sérica total, albumina, concentração de glicose, hemograma completo e níveis séricos de IgA.</p>
8	<p>Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats.</p> <p>Abraham, P. &amp; Rabi, S.</p> <p>Redox Report, 2011.</p>	Vellore, Índia.	<p>Os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1: CF Grupo 2: AG + CF Grupo 3: AG Grupo 4: controle.</p> <p>Foi induzido o dano renal nos ratos através de uma única dose intraperitoneal de CF de 150 mg/kg. Foi realizada administração de 200 mg/kg de aminoguanidina (AG) uma hora antes da administração de CF (Grupo 2).</p>	Ratos Wistar machos	<p><u>MDA:</u> foi 52% maior no grupo CF quando comparado ao controle e o AG atenuou essa elevação.</p> <p><u>GSH:</u> foi 46% menor no grupo CF do que no controle e o AG restaurou completamente seus níveis.</p> <p><u>Enzimas GPx e GST:</u> apresentaram redução de 27% e 35% respectivamente nos rins dos animais tratados com CF quando comparados ao controle e o AG restaurou quase completamente suas atividades.</p> <p><u>Nível de catalase:</u> foi 29% menor nos rins dos animais do grupo CF quando comparado ao controle e o AG restaurou completamente sua atividade.</p>

			<p>Todos os animais foram eutanasiados 16h após a administração de CF ou solução salina (no caso do grupo controle).</p> <p>Os rins foram utilizados para análises histológicas e bioquímicas.</p>		<p><u>Pré-tratamento com AG:</u> sozinho não afetou significativamente os parâmetros bioquímicos, contudo, atenuou o dano renal, preveniu a peroxidação lipídica, a oxidação proteica, a depleção da GSH reduzida e a redução da atividade de enzimas antioxidantes, incluindo GPx, catalase, GST e a atividade da mieloperoxidase (marcador da infiltração de neutrófilos).</p> <p>Histologia: Os rins do grupo controle AG mostraram arquitetura normal; o efeito tóxico da CF envolveu os glomérulos, túbulos e interstício, sendo observada nefrite glomerular; os animais tratados com AG + CF mostraram-se em normalidade.</p> <p>Foi concluído que o AG pode prevenir o dano renal causado pela CF por inibição do estresse oxidativo.</p>
9	<p>Probiotics <i>Lactobacillus</i> strain protect against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide- treated mice.</p> <p>Salva, S. et al.</p> <p>International immunopharmacology, 2014.</p>	Tucuman, Argentina	<p>Foram realizados 2 experimentos onde todos os camundongos receberam CF com intervenção de duas cepas de <i>Lactobacillus</i>: <i>L.casei</i> e <i>L.rhamnosus</i>.</p> <p>Cada experimento teve 3 grupos, com 6 camundongos:</p> <p>G. 1: CF G. 2: Lc 431 + CF G. 3: Lr 1506 + CF</p> <p>Os grupos 2 receberam <i>L. casei</i> a partir do 2º dia e os grupos 3 receberam <i>L. rhamnosus</i> a partir do 5º dia até o 10º dia, quando foi administrada uma dose intraperitoneal de 150 mg/kg<sup>-1</sup> de CF.</p> <p>Experimento 1: avaliou a capacidade dos probióticos de proteção nos</p>	36 camundongos Swiss machos	<p><u>Leucócitos:</u> apresentaram um menor valor no 3º dia, após a administração de CF, atingindo o valor normal no 8º dia. Os grupos tratados com <i>Lactobacillus</i> apresentaram número de leucócitos sanguíneos parecidos ao grupo CF, contudo, no 3º dia estes valores se apresentaram maiores nos grupos tratados com probióticos, retornando aos valores normais um dia antes que o grupo CF.</p> <p><u>Neutrófilos:</u> houve redução significativa entre o 2º e 6º dia após a administração de CF. No 7º dia houve aumento de neutrófilos, ultrapassando os valores normais e no 17º dia os valores retornaram à normalidade. Só foi observada diferenças entre os grupos entre o 7º e 10º dia após a administração de CF, quando os valores dos grupos que receberam probióticos foram significativamente maiores que o controle.</p> <p><u>Resistência contra infecção por <i>C. albicans</i>:</u> o percentual de sobrevivência do grupo CF após 21 dias de infecção foi 40%, o grupo Lc431+CF e o Lr1506+CF apresentaram 70% e 60% respectivamente. Indicando que camundongos</p>

			<p>camundongos tratados com CF contra a mielossupressão e imunossupressão.</p> <p>Experimento 2: avaliou a capacidade dos probióticos para acelerar a recuperação da resposta imune contra o patógeno oportunista <i>Candida albicans</i>. Nesse grupo, os animais receberam também uma injeção intraperitoneal de <i>C. albicans</i> ao 3º dia.</p>		<p>tratados apenas com CF apresentam maior suscetibilidade à candidíase do que aqueles que receberam suplementação com <i>Lactobacillus</i>.</p>
10	<p>Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative Stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes</p> <p>Tripathi, D.N; G.B. Jena, G.B.</p> <p>Mutation Research, 2010.</p>	<p>Mohali, Índia.</p>	<p>Avaliação do pré-tratamento – Os ratos foram submetidos a pré-tratamento com 25mg/kg de peso Astaxantina (AST) por 4 dias e no 4º dia foi aplicada uma dose de 50mg/kg de CF 1h após a AST. Os animais foram eutanaziados 24h após o tratamento com CF.</p> <p>G. 1: controle G. 2: 4 dias de AST G. 3: CF no 4º dia G. 4: 4 dias de AST + CF.</p> <p>Avaliação do pós-tratamento – Os animais receberam 25mg/kg de AST 10 dias após o tratamento com 50mg/kg de CF. Todos os animais foram eutanaziados 24h após a aplicação de AST.</p> <p>G. 1: controle G. 2: 10 dias de AST G. 3: CF no 1º dia G. 4: CF no 1º dia + 10 dias AST.</p>	<p>Ratos machos</p>	<p><u>Efeito da AST no estresse oxidativo induzido por CF:</u> O tratamento com CF induziu um aumento significativo no nível de MDA e reduziu o nível de GSH quando comparado ao grupo controle. A AST tanto como pré ou pós-tratamento demonstrou redução no estresse oxidativo.</p>

			Avaliação de estresse oxidativo – foi realizada no fígado através dos níveis de marcadores malonaldeído (MDA) e glutatona reduzida (GSH).		
11	<p>Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid.</p> <p>Patra, K. et al.</p> <p>Chemico-Biological Interactions, 2012.</p>	Kolkata, Índia.	<p>Os animais foram divididos em 4 grupos:</p> <p>G. 1: controle G. 2: ácido cianâmico (AC) G. 3: CF G. 4: CF + AC.</p> <p>A CF foi administrada por injeção intraperitoneal na dosagem de 50 mg/kg, os animais tratados com AC receberam doses orais de 15, 30 e 60 mg/kg de AC, 15 dias antes da CF em dias alternados. Os animais foram eutanasiados 24h após a aplicação de CF.</p>	20 camundongos machos Swiss albino.	<p><u>Ação do AC:</u> causou redução da hipocelularidade da medula óssea e do baço, devido à indução por CF e estresse oxidativo da medula óssea e fígado.</p> <p><u>Provas hepáticas:</u> não foi observada diferença significativa nos valores de ALT e AST entre os grupos.</p> <p><u>Peroxidação lipídica:</u> o grupo tratado com CF apresentou níveis significativamente maiores de malonaldeído (MDA), na medula óssea e no fígado, do que o grupo controle. O AC reduziu os níveis de MDA, sob a forma dose dependente.</p> <p><u>Enzimas antioxidantes:</u> as enzimas CAT, SOD e glutatona-S-transferase apresentaram elevação significativa no grupo tratado com AC, contudo, não houve relação dose dependente.</p>

12	<p>Evaluation in broilers of the probiotic properties of <i>Pichia pastoris</i> and a recombinant <i>P. pastoris</i> containing the <i>Clostridium perfringens</i> alpha toxin gene.</p> <p>Gil de los Santos, J. R. et al.</p> <p>Veterinary Microbiology, 2012.</p>	Pelotas, Brasil.	<p>Os animais foram divididos em 4 grupos:</p> <p>G. 1: controle  G. 2: <i>P. pastoris</i>  G. 3: <i>P. pastoris</i> recombinante com <i>C. perfringens</i> alfa toxina tipo A  G. 4: <i>B. cereus</i> var. <i>Toyo</i></p> <p>O experimento teve duração de 49, os animais receberam 1 a 10<sup>6</sup> g<sup>A1</sup> de células viáveis ou esporos dos microrganismos;</p> <p>A eficiência alimentar foi avaliada de acordo com peso final subtraído do peso inicial dos animais e a conversão alimentar foi obtida através da divisão do ganho de peso por grupo pelo consumo total de alimento por grupo.</p> <p>Foram realizadas análises histopatológicas de: fígado, pulmões, rins, baço coração, cérebro, pâncreas e intestino grosso.</p>	40 frangos fêmeas	<p><u>Ganho de peso:</u> o maior ganho de peso foi encontrado significativamente no grupo G3, seguido de G4, G2 e G1.</p> <p><u>Conversão alimentar:</u> os melhores índices foram encontrados respectivamente nos grupos G3, G2, G4 e G1. Os animais do G3 consumiram menos 8,9% e do G2 6,6% de ração do que o grupo controle para atingir o mesmo peso final.</p> <p><u>Histopatologia:</u> não foram encontradas lesões significativas macroscópicas e microscópicas, mesmo nos grupos com maior ganho de peso, nem foram encontradas lesões inflamatórias em quaisquer órgãos indicando que ambas <i>P. pastoris</i> (nativa e recombinante) podem ser utilizadas em frangos pois possuem propriedades como probiótico.</p>
13	<p>Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia.</p> <p>Faber, J. et al.</p> <p>The Journal of Nutrition, 2011.</p>	Utrecht, Holanda	<p>Os camundongos foram divididos em 3 grupos:</p> <p>G 1 C: controle  G 2 C-PT: dieta controle + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> + CF  G 3 SNC-PT: combinação nutricional específica (SNC)* + <i>P. aeruginosa</i> + CF</p> <p>Para estabelecer a colonização com <i>P. aeruginosa</i> os camundongos foram</p>	50 camundongos fêmeas C3H/HeN	<p><u>Peso corporal e ingestão alimentar:</u> No começo do estudo o peso corporal dos animais foram semelhantes, a partir do 20º dia o grupo SNC-PT apresentou maior ganho de peso. Após a quimioterapia o peso dos 2 grupos declinou comparado com o grupo controle. Não houve diferença significativa na ingestão alimentar dos 3 grupos.</p> <p><u><i>Pseudomonas aeruginosa</i>:</u> No dia 13 a colonização por <i>P. aeruginosa</i> foi menor no grupo SNC-PT. Após o tratamento quimioterápico os níveis de <i>P. aeruginosa</i> na amostra de fezes diminuíram nos 2 grupos, entre o 30º e 31º dia a colonização foi menor no grupo SNC-PT e o pH</p>

		<p>pré-tratados com antibiótico (ampicilina) nos dias -2,-1 e 0. Depois, no dia 0, os animais foram infectados por <i>P. aeruginosa</i> resistente à ampicilina.</p> <p>A colonização por <i>P. aeruginosa</i> foi mensurada a partir das amostras fecais e a colonização intestinal foi obtida após 5 dias.</p> <p>No dia 6 os camundongos dos grupos com <i>P. aeruginosa</i> foram randomizados de acordo com o peso corporal e nível de colonização antes de começar a intervenção nutricional.</p> <p>Após 3 semanas de intervenção nutricional, foi induzida a neutropenia e o dano à mucosa através da quimioterapia. Nos dias 28 e 30 os animais receberam CF, induzindo a disseminação da <i>P. aeruginosa</i> e a translocação sistêmica. Foi coletado sangue para determinar o grau de neutropenia.</p> <p>No dia 33, 5 dias após a 1ª dose de CF, foi coletado amostra de sangue para mensurar as citocinas pró-inflamatórias e estabelecer o estado de inflamação e neutropenia. Depois os camundongos foram eutanasiados sendo retirados o fígado e o pulmão para determinação da translocação bacteriana nesses órgãos. A amostra do conteúdo intestinal foi obtida por</p>	<p>fecal também foi mais baixo no grupo SNC-PT no 7º e 31º dia e nos dias 28 e 33 foi encontrada maior quantidade de lactobacillus nas fezes do grupo SNC-PT comparado com o grupo C-PT. A redução do pH fecal pode ser devido à formação de butirato, acetato e lactato formados a partir da fermentação de oligossacarídeos (prebióticos). O baixo ph pode levar à inibição do crescimento e adesão de patógenos.</p> <p><u>Neutropenia induzida por CF:</u> Após o tratamento quimioterápico, os camundongos de ambos os grupos ficaram neutropênicos. O número de linfócitos e de células brancas totais diminuíram, não houveram diferenças nos tipos celulares dos dois grupos.</p> <p><u>Translocação de <i>P. aeruginosa</i>:</u> A translocação bacteriana para o fígado foi menor no grupo SNC-PT do que no grupo C-PT e a translocação para o pulmão tendeu a ser menor também (<math>p=0,053</math>). No grupo C-PT: 3 mortes por infecção.SNC-PT</p> <p><u>Citocinas plasmáticas e PGE2:</u> A concentração de citocinas foi maior no grupo C-PT do que no controle e tendeu a ser menor ainda no grupo SNC-PT (<math>p=0,10-0,38</math>), a variabilidade dentro do grupo pode ser responsável por a diferença não ser significativa. As citocinas pró-inflamatórias foram correlacionadas com a intensa translocação bacteriana no fígado.</p>
--	--	--	---



			<p>lavagem de íleo e foi removido o conteúdo do ceco.</p> <p>* SNC: elevada quantidade de proteína, L-leucina, óleo de peixe e oligossacarídeos específicos.</p>		
14	<p>Sinergismo dos probióticos <i>Saccharomyces boulardii</i> E <i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi sobre a imunomodulação em camundongos.</p> <p>Castelli, R. M.</p> <p>Dissertação de mestrado Ciência e Tecnologia Agroindustrial/ UFPel, 2011.</p>	<p>Pelotas, Brasil.</p>	<p>Para avaliar a resistência dos probióticos no TGI de camundongos, os animais foram divididos em 3 grupos:</p> <p>G 1: <i>S. boulardii</i> e <i>B. cereus</i> var. toyoi.  G 2: <i>S. boulardii</i>.  G 3: <i>B. cereus</i> var. toyoi.</p> <p>A administração dos probióticos foi realizada em dose única por via oral através de gavagem. As fezes dos animais foram coletadas 24, 48 e 72h após a administração dos microrganismos e foram calculadas as taxas de sobrevivência dos probióticos individualmente e quando administrados juntos.</p> <p>Foi avaliada também a taxa de sobrevivência dos probióticos em condições simuladas ao TGI de humanos.</p> <p>Para avaliar o efeito imunomodulador da associação dos dois probióticos, os</p>	<p>63 camundongos BALB/c fêmeas</p>	<p><u>Resistência dos probióticos ao TGI:</u> Ambos os probióticos apresentaram elevadas taxas sobrevivência (<i>S. boulardii</i>, em média 94,4% e <i>B. Toyoi</i>, em média 84,5%) e, quando associados (<i>S. boulardii</i>, em média 92,2 % e <i>B. Toyoi</i>, em média 76,3%).</p> <p><u>Resistência dos probióticos co-administrados ao TGI de camundongos:</u> Os probióticos <i>B. Toyoi</i> e <i>S. boulardii</i>, tanto administrados individualmente quanto associados, apresentaram elevadas taxas de sobrevivência 24h após a ingestão (<i>S. boulardii</i>, em média 64.4 % e <i>B. Toyoi</i>, em média 82.4%). 48h após a ingestão, pode-se observar uma queda nessas taxas (<i>S. Boulardii</i>, em média 54.7 % e <i>B. Toyoi</i>, em média 51,8%). Porém, só houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência entre os grupos após 72h, onde somente o probiótico <i>S. boulardii</i>, administrado tanto individualmente quanto associado, sobreviveu ao TGI dos camundongos (<i>S. boulardii</i> individualmente= 44.8 e associado a <i>B. Toyoi</i> = 31,5%).</p> <p><u>Imunidade humoral (IgG total):</u> os soros dos animais pertencentes aos grupos alimentados com os probióticos apresentaram títulos estatisticamente superiores ao controle e que os soros do grupo em que os probióticos foram administrados de forma associada apresentou o</p>

			<p>camundongos foram divididos em 4 grupos com 12 animais em cada.</p> <p>G 1: controle  G 2: <i>S. boulardii</i>.  G 3: <i>B. cereus</i> var. <i>toyo</i>.  G 4: <i>S. boulardii</i> e esporo de <i>B. cereus</i> var. <i>toyo</i>.</p> <p>Os camundongos tiveram 15 dias para adaptação à ração com probióticos e a receberam durante todo o experimento. No dia zero e 15, os animais foram imunizados via intramuscular com aproximadamente 3µg da proteína internalina A recombinante (rInIA) de <i>L. monocytogenes</i>.</p> <p>Para a avaliação da resposta imune humoral, soros dos animais imunizados foram coletados nos dias zero (pré-imune) e 29 após a imunização.</p>		<p>maior título, estatisticamente superior aos dos demais grupos.</p> <p><u>IgG1 e IgG2a</u>: os soros dos animais do grupo em que os probióticos foram associados apresentaram os maiores títulos de IgG1 rInIA específica, seguido pelos soros dos animais do grupo administrado somente com <i>S. boulardii</i> e com <i>B. Toyoi</i>. Entretanto, a diferença foi significativa no grupo onde os animais foram administrados de forma associada em relação aos outros.</p> <p><u>IFN-γ</u> - Não houve diferença significativa nas concentrações de IFN-γ entre os grupos.</p>
15	<p>Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative Stress from tert-Butyl Hydroperoxide</p> <p>Ou, C. et al.</p> <p>Journal of Food and Drug Analysis, 2012.</p>	Taichung, Taiwan.	<p>O estudo investigou o dano oxidativo causado pelo tert-butil-hidroperóxido (t-BHP) nas células HepG2 (células presentes em hepatocarcinomas) e o efeito de extratos intracelulares e células mortas de <i>L. acidophilus</i> Lal2, <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb23, <i>Bifidobacterium longum</i> B136 e <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> St28 sobre as células HepG2.</p>	<i>In vitro</i>	<p>O dano tóxico aos hepatócitos causado por t-BHP foi atenuado pelas bactérias ácido-lácticas, o efeito protetor ocorreu por redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e reativação de enzimas antioxidantes.</p>

			<p>Primeiramente foram utilizadas dosagens 1 mM, 1,5 mM e 3 mM de t-BHP e então foi selecionada a dosagem de 3 mM para o experimento seguinte com bactérias ácido-lácticas.</p> <p>As células foram tratadas com bactérias ácido lácticas antes da exposição a t-BHP.</p>		
16	<p>The glutathione disulfide mimetic NOV-002 inhibits cyclophosphamide-induced hematopoietic and immune suppression by reducing oxidative stress</p> <p>Diaz-Montero, M. C. et al.</p> <p>Free Radical Biology &amp; Medicine, 2012.</p>	Miami, EUA	<p>Os animais foram divididos em 3 grupos, com no mínimo 3 e no máximo 5 animais.</p> <p>G 1: controle G 2: CF (200mg/kg no dia 0). G 3: CF + NOV-002 (25mg/kg de NOV-002 por até 7 dias, começando no dia anterior a CF).</p> <p>Nos dias 3 e 7 os animais foram eutanasiados.</p> <p>Foram avaliadas espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelas células-tronco hematopoiéticas da medula óssea e pelas células supressoras derivadas de mielóides, a razão glutathione reduzida/glutathione oxidada e a expressão de RNAm de enzimas antioxidantes de células-tronco progenitoras hematopoiéticas, entre outros parâmetros.</p>	Camundongo machos C57BL/6 (Ly5.2)	<p>O tratamento com NOV-002 reduziu as células tronco progenitoras hematopoiéticas e reverteu a imunossupressão de células supressoras, o que conduziu a uma melhora significativa das funções imunológicas e hematopoiéticas. Esses efeitos do NOV-002 podem ser atribuídos a capacidade de modulação do redox celular. O NOV-002 regula a expressão de superóxido dismutase 3 e glutathione peroxidase 2 em células tronco progenitoras hematopoiéticas, inibiu o aumento de espécies reativas de oxigênio produzidas por essas células e células supressoras derivadas de mielóides. Atenuou a redução da razão glutathione reduzida/glutathione oxidada nos esplenócitos. O NOV-002 reduz a supressão imune e hematopoiética causada pela CF.</p>

17	<p>Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)-<math>\gamma</math> Ligand, but Not PPAR-<math>\alpha</math>, Ameliorates Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver.</p> <p>El-Sheikh, A. A. K. &amp; Rifaai, R. A.</p> <p>PPAR Research 2014. DOI: 10.1155/2014/626319</p>	Minia, Egito.	<p>Inicialmente os animais foram acompanhados por 2 semana para promover sua climatização após, foram divididos em 6 grupos contendo 8 animais cada.</p> <p>G 1: Controle G 2: FEN / PIO G 3: CF G 4: FEN + CF G 5: PIO + CF G 6: FEN / PIO + CF</p> <p>Foi administrado: FEN 150mg/kg/dia, PIO 10mg/kg/dia e CF 150mg/kg 5 dias antes da eutanásia conforme os animais/grupos.</p> <p>Foram avaliadas alterações de peso/grupo em relação ao G1; marcadores de função hepática e hepatotoxicidade: bilirrubina total, albumina, ALT, AST, ALP e LDH no soro; marcadores de estresse oxidativo: GSH, óxido nítrico (ON) e MDA; atividade enzimática antioxidante: CAT, SOD, GPx e GST; citocina pró-inflamatória TFN; e análise histopatológica do fígado dos animais.</p>	48 ratos albinos adultos	<p><u>Análise histopatológica:</u> os animais dos grupos controle, FEN e PIO apresentaram órgãos normais, o grupo FEN+CF não apresentou melhora quando comparado ao grupo CF com múltiplos focos de necrose, alterações gordurosas e infiltração celular inflamatória, já o PIO+CF apresentou melhora acentuada na imagem histológica.</p> <p><u>Alteração de peso:</u> os resultados foram significativamente menores no grupo CF enquanto a relação peso x peso total aumentou significativamente em comparação ao controle; o tratamento FEN+CF não promoveu melhora nos parâmetros; e PIO+CF demonstrou uma melhora, porém não significativa.</p> <p><u>Função hepática:</u> no grupo CF, os parâmetros bioquímicos sofreram alterações significativas com aumento dos níveis de bilirrubina total, ALT, AST, ALP e LDH e diminuição significativa da albumina do soro. O grupo FEN+CF não promoveu melhora nos parâmetros, contudo, o grupo PIO+CF apresentou uma melhora significativa quando comparado ao CF.</p> <p><u>Estresse oxidativo:</u> o tratamento com CF reduziu significativamente o GSH em comparação ao grupo controle; a administração de FEN não promoveu a restauração dos níveis de GSH diferentemente do PIO que mostrou um aumento significativo. O grupo CF apresentou maiores níveis de MDA e ON quando comparados ao controle e o tratamento com o PIO, conseguiu a reversão de MDA e NO para níveis estatisticamente significativos do grupo CF.</p> <p><u>Atividade enzimática antioxidante:</u> a atividade da CAT, SOD, GPX e GST foi significativamente menor no grupo CF em comparação ao controle, apenas o grupo PIO, obteve aumento significativo quando comparado ao CF.</p>
----	--	---------------	--	--------------------------	--

					<p><u>Citocina pró-inflamatória TFN</u>: os níveis séricos e hepáticos de TFN foram significativamente maiores no grupo CF do que controle e apenas o grupo PIO mostrou redução significativa dos valores de TNF tanto no soro quanto no fígado, quando comparados ao grupo CF.</p>
18	<p>Efeito da levedura <i>Pichia pastoris</i> sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos <i>Swiss</i> submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida</p> <p>Cunha, L. R.</p> <p>Dissertação de mestrado Nutrição e Alimentos/ UFPel, 2016.</p>	<p>Pelotas, Brasil</p>	<p>Os animais foram divididos em 4 grupos:</p> <p>G.1: Controle G.2: CF G.3: Pp G.4: CF + Pp</p> <p>Foram administradas 2 injeções intraperitoneais de CF, uma no 10<sup>o</sup> e outra no 13<sup>o</sup> dia de experimento totalizando 250 mg.kg<sup>-1</sup> e os animais receberam concentrações de 10<sup>9</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> do probiótico.</p> <p>Foram analisados: leucograma, avaliação da segurança do uso, peso corporal e estresse oxidativo (TBARS).</p>	<p>20 camundongos <i>Swiss</i> machos</p>	<p><u>Leucograma</u>: a CF e a Pp apresentaram efeito significativo sobre os valores de leucócitos totais e neutrófilos, houve também significativa interação entre estas células e, para linfócitos observou-se apenas efeito significativo com a CF.</p> <p><u>Avaliação da segurança</u>: a levedura não atuou como microrganismo oportunista pois não houveram óbitos, em relação às lesões renais e hepáticas, observou-se diferença significativa entre os grupos Controle e CF e entre CF e CF+Pp.</p> <p><u>Peso</u>: foi observado que houve diferença significativa para perda de peso entre os grupos Controle e CF e entre CF e CF+Pp; a variação de peso foi significativamente maior no grupo CF, demonstrando o efeito do fármaco.</p> <p><u>Estresse oxidativo</u>: houve interação significativa sobre os níveis de TBARS entre os grupos CF e Pp no rim e no cérebro; Pp apresentou efeito significativo sobre os níveis de TBARS no fígado e no cérebro; pode-se observar também uma correlação positiva e significativa entre os níveis de TABRS no fígado e no cérebro.</p>

Os artigos selecionados na revisão de literatura demonstram o potencial imunossupressor e oxidativo da CF. Contudo, têm-se observado o efeito positivo que alguns probióticos são capazes de desempenhar na reversão da imunossupressão e de alguns parâmetros de estresse oxidativo causados por esse quimioterápico. A maioria dos estudos que relacionam probióticos com resposta imune, peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes foi realizado com bactérias ácido-láticas e em distintas condições, sendo raramente relacionado a quimioterápicos.

A levedura *P. pastoris* tem sido analisada principalmente sobre os índices de ganho de peso e conversão alimentar, contudo, estudos preliminares desenvolvidos na Universidade Federal de Pelotas demonstraram resultados promissores com relação ao potencial efeito probiótico desta levedura. Logo, a avaliação do comportamento de diversos parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo se fazem necessários para ampliar os conhecimentos a respeito da interação da levedura em modelos de imunossupressão.

## 6. Material e Métodos

### 6.1 Probiótico e condições de cultivo

A levedura *P. pastoris* que será utilizada nesse trabalho será proveniente do banco de micro-organismos do Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPel). A levedura congelada, suspensa em glicerol à 80%, será semeada em duplicata em recipiente erlenmeyer contendo 10 ml de meio de cultura Yest Malt Broth (YM), incubados por 24 h à 28°C (solução de *P. pastoris*). A seguir, serão homogeneizados em outro recipiente 90 ml de meio YM adicionados de 10 ml de solução de *P. pastoris* que serão incubados por 24 h a 28°C (solução 2). Na etapa seguinte, serão adicionados 375 ml de meio YM e 25 ml da solução 2 de *P. pastoris* (etapa realizada em duplicata). O cultivo será centrifugado inicialmente a 700 rpm sob refrigeração de 4°C por 10 minutos para separar o *pellet* do meio e, após, o *pellet* será lavado duas vezes com 300 ml de solução salina (NaCl 0,9%) através da centrifugação nas mesmas condições. A concentração de *P. pastoris* será determinada através da diluição em série decimal do cultivo em solução salina estéril e da contagem das UFCs.mL<sup>-1</sup> em placas contendo meio YM, após a incubação das mesmas à 37° C por 24h.

### 6.2 Avaliação do efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo em camundongos Swiss com imunossupressão induzida por ciclofosfamida

#### 6.2.1 Animais e delineamento do estudo

Serão utilizados 60 camundongos Swiss machos com 28 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFPel. Todos os animais receberão dieta padrão para roedores e água esterilizada *ad libitum*. Os animais serão mantidos em gabinetes de 27x19x20 cm, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 500 mL contendo um máximo de cinco camundongos por gabinete em ambiente com temperatura de 22-24°C, umidade relativa de 65-75% e ciclos de luz e escuridão de 12h. Os ensaios biológicos serão desenvolvidos no Biotério Central da UFPel.

Os animais serão randomizados e divididos em quatro grupos, cada um com 8 animais, da seguinte forma:

- Grupo controle (C): receberá solução salina estéril por gavagem e duas injeções via intraperitoneal de solução salina estéril, a fim de simular o mesmo estresse causado pela gavagem e pelas injeções, respectivamente;

- Grupo ciclofosfamida (CF): receberá solução salina estéril por gavagem e duas injeções de CF (dose total de 250 mg/kg<sup>-1</sup>);

- Grupo *P. pastoris* (PP): receberá suplementação diária de 10<sup>8</sup> UFC da levedura *Pichia pastoris* por gavagem e duas injeções via intraperitoneal de solução salina estéril;

- Grupo ciclofosfamida + *P. pastoris* (CF + PP): receberá duas injeções de CF (dose total de 250 mg/kg<sup>-1</sup>) e suplementação diária de 10<sup>8</sup> UFC da levedura *Pichia pastoris* por gavagem.

A suplementação com o probiótico começará doze dias antes da primeira injeção de CF e continuará até o fim do estudo. Ocorrerá coleta de sangue de todos os animais ao início do estudo através da veia facial, conforme os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (DOU, 2016).

No 13<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dia será realizada a imunossupressão induzida por CF nos grupos CF e CF + PP e os animais sofrerão eutanásia no 17<sup>o</sup> dia de estudo. Previamente à eutanásia, os camundongos serão deixados em jejum de 6 horas, após serão anestesiados com isoflurano e, em seguida, submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo COBEA.

Os órgãos fígado, cérebro e rins serão removidos assepticamente. Uma parte será pesada e envolvida em papel alumínio, para congelamento a -70°C em ultra freezer até o momento das análises de estresse oxidativo; e a outra parte será acondicionada em tubo falcon contendo formol a 10% e encaminhada para análise histopatológica no Laboratório de Histologia do Núcleo de Biotecnologia, CDTec - UFPel.

Ocorrerá também uma coleta de sangue no momento da exsanguinação, sendo o material coletado acondicionado em tubos com EDTA para o hemograma completo e em tubos heparinizados para as demais análises bioquímicas.



### **6.2.2 Imunossupressão induzida por CF**

A imunossupressão induzida por CF será realizada de acordo com modelo previamente descrito (ZULUAGA et al., 2006). A infusão de CF será realizada via intraperitoneal e o tratamento será realizado em dois momentos. A primeira dose de CF ocorrerá no dia treze do estudo, quando será aplicada em cada animal dos grupos CF uma injeção com  $150 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso de CF. No dia dezesseis a segunda dose será aplicada com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , totalizando uma dosagem de  $250 \text{ mg.kg}^{-1}$  de CF.

### **6.2.3 Análise histopatológica**

Para avaliar a ocorrência e a gravidade de lesões nos órgãos dos animais, será realizada análise histopatológica de amostras de fígado e rins de todos os animais no Laboratório de Histologia do Núcleo de Biotecnologia, CDTec - UFPel.

### **6.2.4 Variação de peso e ingestão alimentar**

Todos os animais serão pesados diariamente para avaliar alteração de peso e, para avaliação da ingestão alimentar, será pesada a quantidade de ração oferecida aos animais/grupo e posteriormente a quantidade que sobrou.

### **6.2.5 Hemograma completo e outros parâmetros bioquímicos**

Será realizado hemograma completo no início (1º dia) e ao final (17º dia) do estudo por meio de análise clínica em laboratório especializado, e será calculada a redução das contagens das células no período. Os níveis normais de neutrófilos para camundongos *Swiss* são de 110 a  $2150 \text{ cells/mm}^3$ . Considera-se neutropenia quando esse valor é inferior a  $100 \text{ cels/mm}^3$  e neutropenia severa quando o nível de neutrófilos encontra-se abaixo de  $10 \text{ cels/mm}^3$  (ZULUAGA et al., 2006).

As análises bioquímicas de AST, ALT, uréia, creatinina, colesterol total, triglicerídeos, colesterol HDL e glicose serão realizadas através de kits comerciais de diagnóstico padronizados LabTeste® para avaliações espectrofotométricas e serão realizadas no Laboratório de Nutrifisiogenômica e Metabologia da Faculdade de Nutrição – UFPel.

### **6.2.6 Avaliação do estresse oxidativo em tecido hepático, cerebral e renal**

A formação de MDA, um índice de peroxidação lipídica, será determinada como descrito por Ohkawa et al. (1979); a atividade da SOD será determinada como

descrito por Klamt et al. (2002); e a atividade da CAT será determinada conforme descrito por Aebi (1984) e as avaliações espectrofotométricas serão realizadas no Laboratório de Nutrifisiogenômica e Metabologia da Faculdade de Nutrição – UFPel.

### **6.3 Análises estatísticas**

As análises estatísticas para as variáveis paramétricas serão realizadas através de ANOVA duas vias (efeito do probiótico, CF e interação probiótico vs. CF), sendo seguidas dos testes post hoc Tukey e Bonferroni quando aplicável e, para as variáveis não paramétricas se utilizará o teste Kruskal-Wallis. O comparativo de dados iniciais vs. finais, será obtido através de ANOVA uma via seguindo de teste post hoc Tukey e Bonferroni quando houver resultado significativo para as variáveis paramétricas e, teste Mann-Whitney para as variáveis não paramétricas. E, em se tratando das variáveis lesão e perda de peso, será aplicado o teste exato de Fisher. Será utilizado o programa Graphpad Prism 6.0, os dados serão apresentados como razão, médias e desvio-padrão e, para todos os testes, será considerado nível de significância de 5%.

## **7. Resultados e Impactos esperados**

Espera-se que os camundongos com imunossupressão induzida por CF e suplementados com *P. pastoris* apresentem alterações satisfatórias nos parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo, corroborando com outros estudos para atestar a capacidade probiótica desta levedura.

Acredita-se que os resultados desse trabalho trarão impacto positivo no que se refere ao manejo dos efeitos tóxicos causados pela farmacoterapia com CF, o que futuramente poderá proporcionar acréscimos diretos e significativos na saúde do paciente oncológico submetido a tratamentos quimioterápicos, melhorando assim seu prognóstico e conseqüentemente sua qualidade de vida.

## 8. Aspectos Éticos

O estudo faz parte de outro estudo “*Avaliação do efeito de probióticos sobre parâmetros imunológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo em um modelo animal de neutropenia induzida por quimioterapia com ciclofosfamida*” aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel sob o n° 23110.006974/2015-40 e ocorrerá de acordo com os princípios éticos determinados pelo COBEA.

## 9. Cronograma

Semestres de Estudo	2º semestre 2016	1º semestre 2017	2º semestre 2017	1º semestre 2018
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X
Qualificação do Projeto		X		
Cultivo de <i>P. pastoris</i>		X	X	
Avaliação do efeito da suplementação com <i>P. pastoris</i> em camundongos <i>swiss</i> com imunossupressão induzida por CF			X	
Avaliação da variação de peso e ingestão alimentar			X	
Avaliação do hemograma completo e outros parâmetros bioquímicos			X	
Avaliação do estresse oxidativo em tecido hepático, cerebral e renal				X
Análise histopatológica do fígado e rins				X
Análise dos resultados e análises estatísticas			X	X
Redação da dissertação e do artigo			X	X
Defesa da Dissertação				X

**10. Orçamento**

<b>Material</b>	<b>Quant.</b>	<b>Valor Unit. (R\$)</b>	<b>Total (R\$)</b>
Colesterol total colorimétrico (kit)	1	180,00	180,00
Catalase obtida de fígado bovino (frasco)	1	304,00	304,00
Epinefrina (frasco)	1	167,00	167,00
<b>Total (R\$)</b>	-----	-----	<b>651,00</b>

Os reagentes citados acima serão comprados com recursos do PROAP do Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos-PPGNA e o restante será fornecido pelo Laboratório de Imunologia Aplicada (CDTec- UFPEl).

## Referências bibliográficas

- AEBI H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121- 126, 1984.
- ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. **Redox report**, v. 16, n. 1, p. 8-14, 2011.
- AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. **Applied microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 809–817, 2013.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. ANVISA, 1999a.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. ANVISA, 1999b.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. 2002.
- BALLUS, C. A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L.; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: Revisão. **Ceppa**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.
- BAMPI, S. R. **Avaliação da Atividade Antioxidante dos Probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi***. 2015. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.
- BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – parte 1. **Nutrir Gerais – Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga-MG, v. 2, n. 3, p. 1-20, 2008.

BLÉHAUT, H.; MASSOT J.; ELMER G. W.; LEVY R. H. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 10, p.353-364, 1989.

BODDY, A. V.; ELMER G.W.; MCFARLAND L.V.; LEVY R.H. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p.796-800, 1991.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **A situação do câncer no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Glossário temático controle de câncer: projeto de terminologia da saúde**. Brasília, 2013.

BUSANELLO, M.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; CHAMBO, A. P. S.; ECKSTEIN, I. I. Probiotics: viable and inactivated cells on the performance, microflora and blood parameters of piglets. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.16, n.2, p.387-396 abr-jun., 2015

CALIXTO-LIMA, L. et al. Dietetic management in gastrointestinal complications from antimalignant chemotherapy. **Nutr. Hosp.**, v. 27, n. 1, p. 65-75, 2012.

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

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

CETIK, S; AYHANCI, A; SAHINTURK, V; Protective effect of carvacroll against oxidative stress and heart injury in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in rat. **Brazilian archives of biology and technology**. v.58, n.4, p.569-576, 2015.

ÇELIK, E.; OZBAY N. E.; ÇALIK P. Use of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol as the Carbon Source for Fermentation Processes by Recombinant *Pichia pastoris*. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v 47, p. 2985-2990, 2008.



COSTA, E. S.; VARAVALLA, M. A. Probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e promoção da saúde. **Revista Científica do ITPAC**. v.4, n.2, 2011.

CREGG, J. The *Pichia* system. Keck Graduate Institute, Claremont, California. Disponível em [http://rctech.com/pichia/pichia\\_system.pdf](http://rctech.com/pichia/pichia_system.pdf) Acesso em 27 de julho de 2017.

CUNHA, L. R. **Efeito da levedura *Pichia pastoris* sobre parâmetros imunológicos e de estresse oxidativo em camundongos *Swiss* submetidos à quimioterapia com ciclofosfamida**. 2016. 99 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

CUPPARI, L. **Guia de Nutrição: nutrição clínica no adulto**. Barueri: Manole, 2002

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

DOU. Diário Oficial da União. **Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016**. "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasil, 2016.

DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; DE MORAES, C. M.; ROCHA, A. R.; DE SOUZA, L. L.; ROSS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 161, n. 1, p.84-90, 2009a.

DUMMER, L. A.; NIZOLI, L. Q.; ROCHA, A. S. R.; DE MORAES, C. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Production and characterization of recombinant bovine herpesvirus type 5 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p.315-316, 2009b.

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

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature reviews clinical oncology**, v. 6, p. 638- 647, 2009.

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

FRANÇA, R. C. **Avaliação do potencial probiótico da levedura *Pichia pastoris***. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

FRANÇA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. C.; MENDONÇA, M.; HAUBERT, L.; SABADIN, G.; OLIVEIRA, P. D.; AMARAL, M. G.; SILVA, W. P.; MOREIRA, A. N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015. 99:7953–7961

FAO - ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Probióticos em los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. **Estudio FAO Alimentación y Nutrición**. Roma, 2006.52p.

GABOARDI, G. C.; ALVES, D.R.; GRIEP, E.; RODRIGUES, A.; FINGER, P.; CONCEIÇÃO, F. R. Suplementação de ração para codornas com *Pichia Pastoris* X-33 produzida em resíduos industriais e o impacto no desempenho zootécnico. **Anais do IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada** ISSN 2237-1672. Porto Alegre-RS, 2016.

GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GIL-TURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. **Veterinary Microbiology**, 2012. 156:448-451

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). **Políticas e ações para prevenção do câncer no Brasil: alimentação, nutrição e atividade física**. 3. reimpr. / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro, 2012.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro, 2015a.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Manual de boas práticas: exposição ao risco químico na central de quimioterapia:**

**conceitos e deveres** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Rio de Janeiro, 2015b.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tratamento do câncer <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento> INCA. Acesso em 19 de março de 2017

INSTITUTO ONCOGUIA. **Tratamento do câncer**. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamentos/77/50/> Acesso em 19 de março de 2017

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 175–181, 2010.

KLAFKE, G. B.; SCHMIDT, G. M.; MOREIRA, G.; PEREIRA, J. L.; OLIVEIRA, P. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; GUERRA, R.; GRASSMANN, O. A.; DELLAGOSTIN, L. S. P. Lectin I from *Bauhinia variegata* (BVL-I) expressed by *Pichia pastoris* inhibits initial adhesion of oral bacteria *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**. DOI <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.062> Aceito em: 16 de setembro de 2016.

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

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

MACK, M. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. **Protein Expr Purif** 66(2): pp 165-171, 2009.

MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. (2005) Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Rev BioCie Terra** ISSN 1519-5228 5(2):1-13

MCCUNE, W.J; MACR, M.D; CLOWSE, M. B. **General principles of the use of cyclophosphamide in rheumatic diseases**. UpToDate. Disponível em: [https://www.uptodate.com/contents/general-principles-of-the-use-of-cyclophosphamide-in-rheumatic-diseases?source=search\\_result&search=ciclofosfamide&selectedTitle=5~150](https://www.uptodate.com/contents/general-principles-of-the-use-of-cyclophosphamide-in-rheumatic-diseases?source=search_result&search=ciclofosfamide&selectedTitle=5~150) Acesso em: 19 de março de 2017.

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

NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DUMMER, L. A.; SANTOS JÚNIOR, A. G.; LEITE, F. P. L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 2, p.1-4, 2009.

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

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

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

PINTO, V. B.; COSTENARO-FERREIRA, C.; OLIVEIRA, P. L. S.; OLIVEIRA, R. R. B.; PIEDRAS, S. R. N.; POUHEY, J. L. O. F. Performance of jundiá larvae, *Rhamdia quelen*, fed on probiotic supplemented diets. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 37, n. 3, p. 215-220, Jul-Sep., 2015

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

RODRIGUES, F. S de S; POLIDORI, M. M. Enfrentamento e resiliência de pacientes em tratamento quimioterápico e seus familiares. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.54, n.4, p. 619-627, 2012.

SAAD, S. M. I. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Varela, 2011.699p.

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

SANTOS, V. M. R dos.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R; Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v.30, n.1, p. 159-170, 2007.

SANTOS, T. T. dos; VARAVALLO, A. M. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. *Revista Científica do ITPAC*, v.4, n.1, 2011.

SIEDLER, B. S.; ROLOFF, B. C.; DE SÁ, G. L.; NEIS, A.; CONCEIÇÃO, F. R.; HARTWIG, D. D.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAMPOS, F. S.; ROEHE, P. M.; HARTLEBEN, C. P.; MCBRIDE, A. J. A. Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. **Protein Expression and Purification**, v.130, p.21-27, 2017.

STORCH O. B. Avaliação como probióticos para frangos de corte de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens*. **Dissertação de mestrado**, Pelotas: 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRAN, A.M. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: A case study on the recombinant production of human granulocytemacrophage colony-stimulating factor, **BMC Res Notes** 10(1): p148, 2017.

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

UPTODATE. **Cyclophosphamide: Drug information**. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/cyclophosphamide-drug-information?source=preview&search=ciclofosfamida&anchor=F13494888#F13494888> Acesso em 19 de março de 2017.

VANDERHOOF, Jon A. Probiotics in Allergy Management. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. Philadelphia, v. 47, n. 2, p. 38-40, nov. 2008.

WAITZBERG, D. L. **Dieta, nutrição e câncer**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2006.783 p.

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

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

## **7. Relatório do trabalho de campo**

O número de animais foi aumentado para 60 e dividido em duas repetições, primeiramente porque devido à quantidade de material coletado, não era possível realizar a eutanásia de 60 animais no mesmo dia, mas, também, porque desejávamos verificar se o protocolo e o manejo funcionariam como o desejado e, corrigir caso se fizesse necessário.

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

Com as amostras coletadas, aprendi como realizar o preparo e processamento do soro para todos os protocolos dos ensaios bioquímicos e de estresse oxidativo utilizados assim como, seus respectivos cálculos. E, aprendi também a utilizar o programa estatístico Graphpad, bem como, a interpretar os resultados produzidos no experimento.

Não foi possível realizar todas as análises bioquímicas propostas no projeto (creatinina, ALT e AST), devido ao pequeno volume de sangue retirado dos animais e a necessidade de dividir o mesmo para a realização das análises de hemograma. Porém, para a segunda repetição, aprendi a fracionar melhor as amostras (sem comprometer a realização do teste), motivo pelo qual, foi possível analisar colesterol total, triglicerídeos e glicose apenas nesta repetição. A análise da enzima antioxidante SOD não foi realizada por falta de verba para a compra dos reagentes necessários para o ensaio.

**Artigo**

**Perfil sanguíneo, estresse oxidativo e desempenho alimentar de camundongos *Swiss* suplementados com *Pichia pastoris* e imunossuprimidos com ciclofosfamida**



## Resumo

A ciclofosfamida é o quimioterápico mais utilizado atualmente no tratamento do câncer, apesar de causar de reações adversas graves como anemia, citotoxicidade, aumento do estresse oxidativo e perda de peso. Por isso, modulação do sistema imunológico através da suplementação probiótica tem sido proposta. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação com *Pichia pastoris* sobre o perfil sanguíneo, estresse oxidativo e desempenho alimentar em camundongos *Swiss* imunossuprimidos por ciclofosfamida. Por 17 dias, 60 animais (em duas repetições) foram divididos em quatro grupos: controle, ciclofosfamida (dose total 250mg/kg), probiótico ( $10^8$  UFC/animal por dia via gavagem) e ciclofosfamida+probiótico e foram avaliados o hemograma completo, parâmetros bioquímicos, de estresse oxidativo e histopatológicos, além do peso e desempenho alimentar, sendo considerado nível de significância de 5%. Animais tratados com ciclofosfamida e suplementados com *P. pastoris* não apresentaram leucopenia e neutropenia, apresentaram menor peroxidação lipídica (rins e encéfalo), lesões nos rins e melhor conversão alimentar do que os animais tratados com o fármaco e não suplementados. Nos animais saudáveis, *P. pastoris* aumentou os parâmetros do hemograma, reduziu peroxidação lipídica e melhorou a eficiência alimentar. Conclui-se que a administração de *P. pastoris* em animais saudáveis e imunossuprimidos é segura e agrega benefícios.

**Palavras chave:** probiótico, levedura, quimioterapia, hemograma, modelo animal.

## Abstract

Cyclophosphamide is the chemotherapy currently used in cancer treatment, although it causes serious adverse reactions such as anemia, cytotoxicity, increased oxidative stress and weight loss. Therefore, modulation of the immune system through probiotic supplementation has been proposed. The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation with *Pichia pastoris* on blood profile, oxidative stress and feed performance in *Swiss* mice immunosuppressed by cyclophosphamide. The animals were divided into four

groups: control, cyclophosphamide (total dose 250mg / kg), probiotic ( $10^8$  CFU/animal per day via gavage) and cyclophosphamide + probiotic, and the complete blood count was evaluated, biochemical parameters, oxidative and histopathological stress, as well as weight and feed performance, being considered a level of significance of 5%. Animals treated with cyclophosphamide and supplemented with *P. pastoris* did not present leucopenia and neutropenia, had lower lipid peroxidation (kidneys and encephalon), lesions in the kidneys and better feed conversion than the animals treated with the drug and not supplemented. In healthy animals, *P. pastoris* increased hemogram parameters, reduced lipid peroxidation and improved feed efficiency. It is concluded that the administration of *P. pastoris* in healthy and immunosuppressed animals is safe and adds benefits.

**Key words:** probiotic, yeast, chemotherapy, blood count, animal model.

## 1. Introdução

A ação sistêmica dos quimioterápicos possibilita o combate ao câncer através da destruição, controle ou inibição das células cancerígenas no indivíduo (Rodrigues & Polidori, 2012; INCA, 2017), agindo nas células com alta capacidade de replicação, tumorais e não tumorais, desencadeando inúmeras reações adversas (Calixto-Lima et al., 2012; INCA, 2015; INCA, 2017).

A ciclofosfamida (CF), antineoplásico do tipo alquilante de maior potência nas terapias imunossupressoras disponíveis, apesar de seu alto potencial tóxico secundário, é largamente utilizada no tratamento contra o câncer, pois impede a divisão celular e inibe a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) (Mccune et al., 2017; UPTODATE, 2017). Sua administração pode acarretar uma reação adversa medicamentosa (Teles et al., 2017), definida pela Food and Drug Administration – FDA (2018) como uma reação não intencional e prejudicial ao organismo, manifestada após a utilização de doses normalmente usadas em humanos para profilaxia, diagnóstico, terapia de doenças ou para modificações de funções fisiológicas.

A toxicidade hematológica é o efeito colateral mais comum e expressivo entre os pacientes que utilizam o fármaco, devido ao fato de que o tecido hematopoiético apresenta elevada taxa de multiplicação celular (Ferdinandi & Ferreira, 2009). Ademais, o aumento dos marcadores de estresse oxidativo, como o aumento da peroxidação lipídica e a redução da atividade de enzimas antioxidantes (Tripathi & Jena, 2010; Abraham & Rabi, 2011; Rehman et al., 2012), hepatotoxicidade, cistite hemorrágica, esterilidade e caquexia, por exemplo, também podem ser desencadeados pelo uso da CF (Santos et al., 2007; Faber et al., 2011; Waitzberg, 2006).

De acordo com Jankovic et al. (2010), pesquisas relacionadas a probióticos – micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002) – tem-se mostrado uma valiosa fonte de dados quanto às vantagens de suas aplicações, uma vez que podem desempenhar papel expressivo no sistema imunológico, digestivo e nas funções respiratórias; contribuir significativamente para aliviar doenças infecciosas em crianças e em

populações saudáveis; e ser utilizados como meio para evitar determinadas patologias, através da modulação do sistema imune (FAO, 2006; Castelli, 2011; Costa & Varavallo, 2011; Carreiro, 2013; Salva et al., 2014). Papel este, também desempenhado em animais conforme relatado por Saad et al. (2006), inclusive quando imunocomprometidos pelo uso de CF (Wei et al., 2007; Bujalance et al., 2007; Salva et al., 2014).

A modulação positiva do sistema imune através da suplementação com probióticos em camundongos *Swiss* imunossuprimidos por CF foi evidenciada nos estudos de Wei et al. (2007) e Salva et al. (2014), contudo, um estudo realizado com camundongos BALB/c verificou que a suplementação com o probiótico *Lactobacillus plantarum* não foi capaz de promover efeito satisfatório na proteção contra a imunossupressão induzida por este fármaco (Bujalance et al., 2007).

*Pichia pastoris* é uma levedura comumente usada para produção de proteínas recombinantes em larga escala (Storch, 2008; Dummer et al., 2009a; Dummer et al., 2009b; Nizoli et al., 2009; Klafke et al., 2016; Siedler et al., 2017), que também se destaca pela sua capacidade de crescimento a partir de resíduos de baixo custo e meios de cultura relativamente simples (Çelik et al. 2008; Gil de Los Santos et al. 2012). Além disso, pelo fato de ser uma levedura, apresenta a vantagem de não ser inibida por substâncias antibacterianas e de ser eliminada rapidamente após a interrupção da terapia, vantagens em relação às bactérias (Martins et al., 2005). Em estudos comparativos, demonstrou superar outros sistemas de fermentação em termos de rendimento e atividade de proteínas recombinantes (Mack, 2009; Tran, 2017), motivo pelo qual pesquisadores demonstraram interesse em avaliá-la como probiótico na produção animal (Storch, 2008; Gil de Los Santos et al. 2012; Gaboardi et al., 2016).

Gil de Los Santos et al. (2012), com o objetivo de avaliar e estimulação do sistema imune e a eficácia alimentar em frangos de corte, testaram as propriedades da levedura na sua forma selvagem e recombinante com o gene  $\alpha$  de *Clostridium perfringens*, obtendo resultados superiores nos animais que receberam ambas as formas da levedura, sobre o ganho de peso, conversão alimentar e soroconversão, em relação ao grupo controle. Já França et al. (2015)

constatarem que a taxa de sobrevivência da levedura, durante a simulação das condições gástricas e intestinais, foi de 76,8%, percentual que a caracteriza como resistente à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) e assegura seus benefícios. Os autores avaliaram ainda seu potencial antimicrobiano, verificando uma favorável proteção na mortalidade dos animais infectados com *Salmonella Typhimurium* e suplementados com o micro-organismo.

Apesar dos estudos realizados com *P. pastoris* demonstrarem efeitos benéficos e o potencial probiótico, as implicações de sua utilização ainda são pouco exploradas, principalmente em imunossuprimidos. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com a levedura *P. pastoris* sobre o perfil sanguíneo, estresse oxidativo e desempenho alimentar em um modelo de imunossupressão induzida por quimioterapia com CF em camundongos *Swiss*.

## **2. Metodologia**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) sob o nº 23110.006974/2015-40 e conduzido no Biotério Central da instituição.

### **2.1 Cultivo do probiótico**

A levedura *P. pastoris* X-33, suspensa em glicerol à 80% e armazenada a -20° C, proveniente do banco de micro-organismos do Núcleo de Biotecnologia (CDTec-UFPel), foi inoculada, em sua totalidade (2 mL), em 10 mL de caldo Yeast Malt (YM) e incubada por 24 h, a 28°C em agitador orbital a 180 rpm. Após, foram adicionados os 10 mL do cultivo a 90 mL de caldo YM e o cultivo foi incubado novamente, sob as mesmas condições durante 24 h. Finalizando o processo, os 100 mL desse cultivo foram transferidos para 1,4 L de YM e incubado por mais 24 h a 28°C sob agitação de 180 rpm em agitador orbital.

Após o processo fermentativo, as células foram recuperadas por centrifugação a 5000 g por 15 minutos a 4°C e o *pellet* celular foi lavado duas vezes com 300 mL de solução salina (NaCl 0,9%) através da centrifugação nas mesmas condições. Na etapa final, o cultivo foi concentrado a um volume de 300

mL em solução salina 0,9% estéril e armazenado sob refrigeração durante todo o período do estudo.

A concentração de *P. pastoris* (expressa em UFC/mL) foi determinada através de diluição seriada decimal em solução salina 0,9% estéril e contagens em placas contendo Agar YM, após incubação das placas a 37°C por 24 h.

## 2.2 Manejo de animais e delineamento experimental

A duração do experimento foi de 17 dias e utilizou-se 30 camundongos *Swiss* machos, com 28 dias de idade.

Os animais foram mantidos em gabinetes de 27x19x20 cm com bebedouro de polipropileno com capacidade para 500 mL contendo um máximo de cinco camundongos cada, em ambiente controlado com temperatura de 22-24°C, ciclos de luz e escuridão de 12 h e troca de gabinete/maravalha duas vezes na semana. Após o desmame, aos 21 dias de idade, os animais foram submetidos à ambientação por sete dias a fim de eliminar quaisquer vieses alimentares, recebendo dieta padrão para roedores (Nuvilab CR-1, Nuvital®) e água esterilizada à vontade durante a ambientação e, também, durante todo o período do experimento.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos: grupo tratado com ciclofosfamida (ciclofosfamida, CF) com 8 animais; grupo suplementado diariamente com *P. pastoris* (*P. pastoris*, PP) com 7 animais; grupo tratado com ciclofosfamida e suplementado diariamente com *P. pastoris* (ciclofosfamida+*P. pastoris*, CF+PP) com 8 animais; e grupo não tratado e não suplementado (controle, C) com 7 animais.

No dia zero, antes do início do estudo, após a pesagem e segregação randomizada dos animais nos grupos, foram coletadas amostras de sangue de todos os animais para o estabelecimento do perfil sanguíneo e para posterior comparação entre os parâmetros iniciais e finais do hemograma. Foi realizada também a pesagem da ração ofertada para análise de consumo alimentar. Os animais dos grupos PP e CF+PP foram suplementados diariamente com *P. pastoris* por via intragástrica, através de gavagem, do dia zero até o último dia do experimento (dia 17) e os dos grupos C e CF receberam solução salina (NaCl 0,9%) pela mesma via e período. Nos dias 13 e 16 foi realizado o protocolo de

imunossupressão nos animais dos grupos CF e CF+PP e, nos dias 13 (antes da imunossupressão) e 17, foram efetuadas as respectivas pesagens de todos os animais e determinações de consumo alimentar por caixa de animais. Finalmente no 17º dia, foi realizada a eutanásia, onde os camundongos foram anestesiados com isoflurano e submetidos ao procedimento de exsanguinação por punção cardíaca, seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo COBEA (DOU, 2016). Foram realizadas coletas de sangue, para o hemograma completo e análise bioquímicas, do encéfalo, do fígado e dos rins, para as análises histopatológicas e de estresse oxidativo.

### **2.3 Suplementação com o probiótico**

Os grupos PP e CF+PP receberam suplementação diária de  $10^8$  UFC/animal da levedura *P. pastoris* no volume de 200  $\mu$ L de cultivo por gavagem durante todo o experimento (do dia zero ao 17). Já os grupos C e CF receberam 200  $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%) pela mesma via, no intuito de simular os mesmos níveis de estresse.

### **2.4 Indução da imunossupressão**

O protocolo de imunossupressão seguiu os parâmetros descritos por Zuluaga et al. (2006), onde os animais do grupo CF e CF+PP receberam duas injeções via intraperitoneal do fármaco CF, diluído em solução salina a 0,9% nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), totalizando uma dose de 250 mg/kg.

### **2.5 Variação de peso, consumo alimentar, índice de conversão alimentar e índice de eficiência alimentar**

Para a avaliação da variação de peso, os animais foram pesados durante o período, nos dias zero (início do estudo), 13 (antes do início da indução da imunossupressão) e no dia 17 (ao final do estudo), e a média do ganho de peso foi obtida subtraindo-se o peso inicial do peso final nos três períodos avaliados: antes da imunossupressão (dia zero a 13), durante a imunossupressão (dia 13 a 17) e durante todo o experimento (dia zero a 17). A média do consumo alimentar também foi avaliada através da subtração do peso da ração oferecida inicialmente aos grupos pela quantidade restante final, sendo determinada nos

dias zero, 13 e 17. Para o cálculo do índice de conversão alimentar (ICA) por grupo nos períodos avaliados, utilizou-se a equação:  $ICA = \text{média de consumo alimentar diário} / \text{média de ganho de peso diário no período}$  e, para obter-se o índice de eficiência alimentar (IEA) por grupo nos períodos, foi utilizada a equação:  $IEA = \text{média de ganho de peso diário} / \text{média de consumo alimentar diário no período}$ .

## 2.6 Hemograma e parâmetros bioquímicos

Para a realização do hemograma completo, a fim de se comparar os parâmetros iniciais e finais, foram realizadas coletas de sangue de todos os animais ao início (dia zero) e ao final do estudo (dia 17), através da veia submandibular e durante a eutanásia. Para isso amostras de 300  $\mu\text{L}$  de sangue/animal foram acondicionadas em tubos com EDTA e imediatamente transportadas sob refrigeração para os laboratórios de análises clínicas.

Foram realizados testes bioquímicos de ureia, glicose, colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG), para isso, amostras de sangue finais (em média 500  $\mu\text{L}$ /animal) foram coletados em microtubos de 1,5mL sem anticoagulante, e as análises foram realizadas utilizando-se kits comerciais de diagnóstico padronizados LabTeste®, para avaliações espectrofotométricas, conforme protocolo descrito pelo fabricante, no Laboratório de Nutrifisiogenômica e Metabologia da Faculdade de Nutrição – UFPel.

## 2.7 Estresse oxidativo

Os órgãos fígado, encéfalo e rins foram removidos assepticamente durante a eutanásia, sendo o encéfalo, um dos rins e dois terços do fígado acondicionados em microtubos de 1,5mL e imediatamente congelados em ultra freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , durante o período máximo de 30 dias, para a avaliação do estresse oxidativo. Posteriormente, para preparo da amostra, foi realizada a pesagem do órgão (não ultrapassando 0,5 mg de tecido) e a adição da solução de tampão Tris em volumes adequados (cinco vezes o peso do cérebro e dez vezes o peso dos demais órgãos) para realização da homogeneização manual. O material foi centrifugado em tubos de ensaio a 3,2 g por 10 minutos à temperatura ambiente, para separação do *pellet*, e os sobrenadantes foram



coletados para realização das análises espectrofotométricas da formação de malondealdeído (MDA), através do protocolo descrito por Ohkawa et al. (1979), e da atividade da enzima catalase (CAT), conforme descrito por Aebi (1984).

## 2.8 Análise histopatológica

Para avaliar a ocorrência e a gravidade de lesões nos órgãos dos animais, foi realizada análise histopatológica de amostras de fígado (um terço) e de um dos rins de todos os animais, no Laboratório de Histologia do Núcleo de Biotecnologia, CDTec – UFPel. As amostras de tecido hepático e renal foram fixadas em formol a 10% (pH 7,0) e, em seguida, embebidas em parafina. Seis secções de 4-5µm de espessura de cada órgão foram coradas com hematoxilina e eosina.

## 2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism 6.0 através dos testes: *Mann-Whitney* para dados assimétricos, Two-way Anova com medidas repetidas entre tratamentos de diferentes períodos e interação, Teste t para dados simétricos, *Tukey* para correlação de variância entre os grupos, *Bonferroni* para análise no período e teste exato de *Fisher* para variáveis categóricas, considerando-se o nível de significância de 5%.

## 3. RESULTADOS

Ao longo do estudo, houve a perda de um animal, devido ao comportamento agressivo que alguns grupos apresentaram. Durante a realização do hemograma, algumas amostras apresentaram coágulos, impedindo a viabilidade da contagem celular (perda de 10 amostras), motivo pelo qual, o comparativo inicial e final das contagens hematimétricas entre os períodos teve um número reduzido.

As médias e desvio padrão do hemograma completo, perfil lipídico, marcador renal e glicose bem como, os resultados significativos ( $p < 0,05$ ) obtidos na análise de variância podem ser observadas na Tabela 1.

**Tabela 1:** Médias,  $\pm$  desvio padrão, do hemograma por grupo, de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados

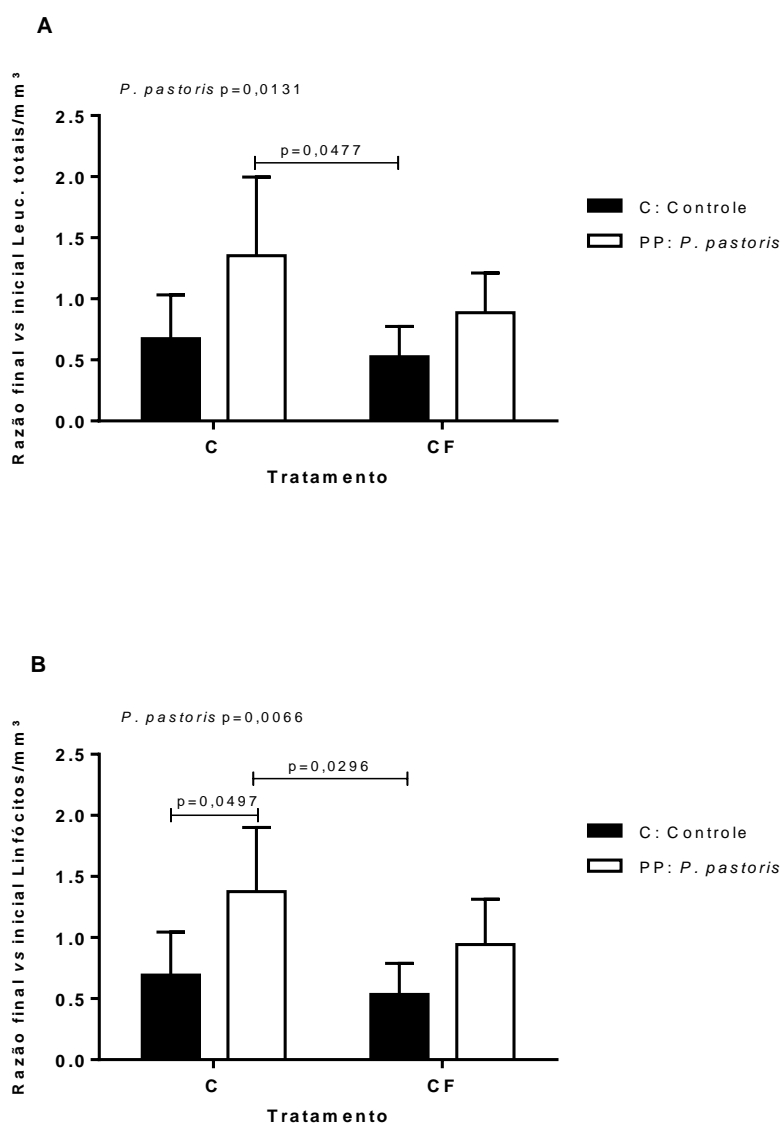
com CF e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle) no dia zero (doze dias antes da 1ª dose de CF), médias  $\pm$  desvio padrão do hemograma e dos parâmetros bioquímicos por grupo, no dia 17 (um dia após a 2ª dose de CF). Valores de  $p < 0,05$  são identificados por letras maiúsculas para comparativo inicial e final e minúsculas para dados do dia 17 (Anova), e testes de múltipla comparação são identificados por \* (Tukey, entre grupos) e  $\alpha$  (Bonferroni, entre períodos).

Hemograma, Parâmetros Bioquímicos	Médias dos valores encontrados nos grupos ( $\pm$ desvio padrão)			
	Controle	CF	PP	CF+PP
<b>Leucócitos</b> (cels/mm <sup>3</sup> )				
Dia 0	3200 $\pm$ 871	3200 $\pm$ 1050 <sup>A</sup>	2673 $\pm$ 753	3328 $\pm$ 482
Dia 17	2010 $\pm$ 880	1493 $\pm$ 278	3238 $\pm$ 604 <sup>a</sup>	3026 $\pm$ 993
<b>Neutrófilos</b> (cels/mm <sup>3</sup> )				
Dia 0	416 $\pm$ 197	429 $\pm$ 315 <sup>A</sup>	352 $\pm$ 242	439 $\pm$ 203
Dia 17*	192 $\pm$ 111	149 $\pm$ 55 <sup>a</sup>	197 $\pm$ 69	212 $\pm$ 103
<b>Linfócitos</b> (cels/mm <sup>3</sup> )				
Dia 0	2708 $\pm$ 674	2701 $\pm$ 717 <sup>A</sup>	2241 $\pm$ 499	2816 $\pm$ 293
Dia 17	1758 $\pm$ 734	1305 $\pm$ 208	2901 $\pm$ 547 <sup>b</sup>	2700 $\pm$ 866
<b>Hemácias</b> (x10 <sup>6</sup> cels/mm <sup>3</sup> )				
Dia 0	9,00 $\pm$ 0,33	9,03 $\pm$ 0,64	9,39 $\pm$ 0,81	9,11 $\pm$ 0,67
Dia 17**	9,36 $\pm$ 0,40	8,62 $\pm$ 0,58	9,31 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	10,14 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)				
Dia 0	14,51 $\pm$ 0,30	14,63 $\pm$ 1,18	15,15 $\pm$ 1,25	14,74 $\pm$ 0,97
Dia 17***	14,70 $\pm$ 0,63	13,53 $\pm$ 0,93	14,65 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	15,94 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>
<b>Hematócrito</b> (%)				
Dia 0	50,13 $\pm$ 0,88	49,40 $\pm$ 3,65	51,73 $\pm$ 3,83 <sup>B</sup>	50,20 $\pm$ 2,76
Dia 17****	48,69 $\pm$ 1,93	45,48 $\pm$ 2,09	50,23 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	53,60 $\pm$ 4,56
<b>VCM</b> (fL)				
Dia 0	55,73 $\pm$ 1,46	54,68 $\pm$ 1,53 <sup>C<math>\alpha</math></sup>	55,20 $\pm$ 1,70	55,22 $\pm$ 1,54
Dia 17	52,03 $\pm$ 1,68	52,90 $\pm$ 1,25	53,98 $\pm$ 1,24	52,84 $\pm$ 1,75
<b>CHCM</b> (%)				
Dia 0	28,96 $\pm$ 0,22	29,63 $\pm$ 0,56	29,25 $\pm$ 0,48	29,34 $\pm$ 0,45
Dia 17	30,20 $\pm$ 0,69	29,78 $\pm$ 1,01	29,18 $\pm$ 0,43	29,78 $\pm$ 0,86
<b>Plaquetas</b> (x10 <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )				
Dia 0	10544 $\pm$ 766	9012 $\pm$ 467	9275 $\pm$ 940	11062 $\pm$ 2397
Dia 17	9114 $\pm$ 2309	7807 $\pm$ 2383	10535 $\pm$ 457	9070 $\pm$ 1728
<b>Ureia</b> (mg/dL)*****	63,58 $\pm$ 7,79	76,50 $\pm$ 6,80 <sup>B</sup>	64,23 $\pm$ 4,66	69,65 $\pm$ 4,54
<b>Colesterol Total</b> (mg/dL)	130,09 $\pm$ 7,15	121,83 $\pm$ 9,29	122,38 $\pm$ 8,07	139,22 $\pm$ 14,53 <sup>A</sup>
<b>Triglicerídeos</b> (mg/dL)	235,57 $\pm$ 26,07	187,11 $\pm$ 39,01 <sup>A</sup>	207,43 $\pm$ 40,13	188,44 $\pm$ 17,48
<b>Glicose</b> (mg/dL)	194,47 $\pm$ 16,20	201,76 $\pm$ 46,03	220,59 $\pm$ 35,82	214,62 $\pm$ 40,58

<sup>A</sup>  $p < 0,05$ , <sup>B</sup>  $p < 0,01$ , <sup>C</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , <sup>b</sup>  $p < 0,01$ ; \* C x CF  $p = 0,0146$ ; \*\* CF x CF+PP  $p = 0,0116$ ; \*\*\* CF x CF+PP  $p = 0,0178$ ; \*\*\*\* CF x CF+PP  $p = 0,0220$ ; \*\*\*\*\* CF x C  $p = 0,0229$  e CF x PP  $p = 0,0428$ ; <sup>u</sup> CF  $p = 0,0004$ ;

### 3.1 Leucograma e contagem de plaquetas

Foi constatada uma redução significativa de 53,4% somente no grupo CF ( $p = 0,0307$ ) nas contagens finais de leucócitos, indicando a manifestação de leucopenia. Observou-se também, uma menor redução (9,1%) da contagem de leucócitos no grupo CF+PP, evidenciando que a levedura foi capaz de evitar uma maior queda nessas contagens e, conseqüentemente, de evitar a leucopenia nos animais tratados com CF. Ressalta-se ainda que as médias finais das contagens de leucócitos do grupo PP foram significativamente maiores ( $p = 0,0104$ ), aumentando em 21,1% quando comparadas aos valores iniciais, e que a razão entre as contagens do dia 17 e do dia 0 também apresentou diferença significativa nos grupos com probiótico ( $p = 0,0131$ , teste Anova), sendo significativamente maior no grupo PP do que no grupo CF ( $p = 0,0477$ , teste *Tukey*), indicando um efeito benéfico da levedura tanto nos animais saudáveis quanto nos imunossuprimidos (Tabela 1 e Figura 1A).



**Figura 1:** Razão entre contagens final (dia 17) e inicial (dia 0) de leucócitos totais (A, células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ) e linfócitos (B, células  $\times 10^6/\text{mm}^3$ ), de camundongos Swiss machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (Tukey) ( $n=20$ ).

Na contagem de neutrófilos, o grupo CF apresentou uma redução significativa ( $p=0,0120$ ) de 65,4% nas contagens celulares, quando comparadas ao dia zero, sinalizando a eficácia do protocolo na indução da neutropenia, enquanto que o grupo CF+PP apresentou uma redução de 51,7% no comparativo inicial e final. Além disso, os grupos PP e CF+PP apresentaram

contagens acima dos valores de referência (grupo C) no dia 17, indicando que a levedura pode ter evitado uma maior redução dessa contagem no grupo que recebeu o fármaco, tendo em vista que o grupo CF apresentou uma redução significativa no dia 17 ( $p=0,0105$ ) sendo significativamente menor no grupo CF do que no grupo C ( $p=0,0146$ , teste *Tukey*) (Tabela 1).

Em relação aos linfócitos, embora não tenha sido observada linfopenia em nenhum grupo avaliado, ao final do estudo (dia 17), foi verificada uma redução significativa nas contagens de linfócitos somente no grupo CF ( $p=0,0488$ ), de 51,7%, diferentemente do observado no grupo CF+PP, onde houve uma redução, não significativa, de somente 4,1%. Já para o grupo PP, houve um aumento significativo ( $p=0,0072$ ) de 29,5% nos valores médios finais (de  $2241\pm 499$  para  $2901\pm 547$  células/mm<sup>3</sup>, respectivamente), e a razão entre as contagens do dia 17 e do dia zero também mostrou diferença significativa ( $p=0,0066$ , teste Anova), sendo significativamente maior no grupo PP do que no grupo CF ( $p=0,0296$ , teste *Tukey*) e do que no grupo C ( $p=0,0497$ , teste *Tukey*) (Tabela 1 e Figura 1B).

Evidenciou-se também que o grupo PP apresentou um aumento na contagem de plaquetas de 13,6% nos valores finais, porém, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos, bem como, no período (Tabela 1).

### 3.2 Eritrograma

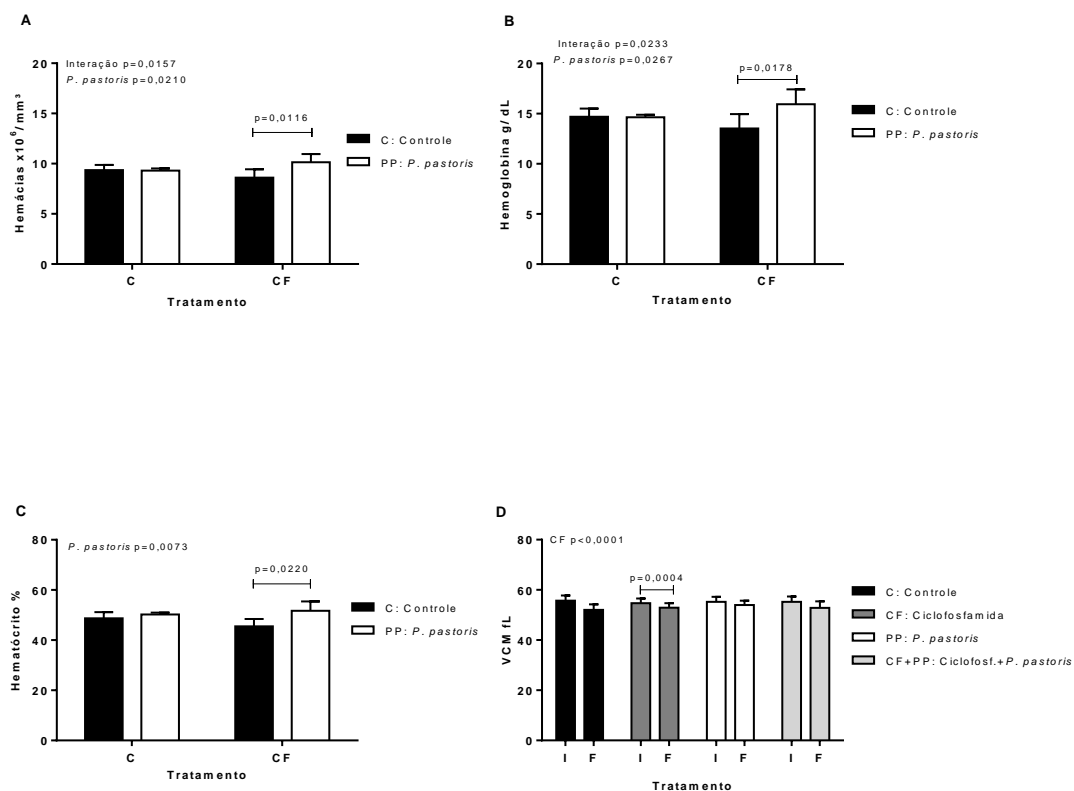
Conforme demonstrado na Tabela 1, na análise das contagens do eritrograma não foram observadas diferenças significativas entre os valores iniciais e finais, apesar do grupo CF+PP ter demonstrado um aumento de 11,4%, enquanto que o grupo CF demonstrou uma redução de 4,6%. Contudo, considerando-se apenas as contagens finais, foi observado que a contagem de hemácias dos grupos que receberam a levedura foram significativamente maiores (Interação  $p=0,0157$  e PP  $p=0,0210$ , teste Anova), sendo os valores do grupo CF+PP significativamente maiores do que do grupo CF ( $p=0,0116$ , *Tukey*), indicando que a levedura foi capaz de melhorar o parâmetro dos animais tratados com CF (Figura 2A).

Quanto aos valores de hemoglobina, apenas os grupos PP e CF+PP, nos dias zero e 17 respectivamente, possuíam valores levemente acima do

observado no grupo C (resultado não significativo), e nenhum grupo apresentou diferença significativa entre os dias zero e 17. No entanto, o grupo CF+PP sinalizou um aumento 8,1% no parâmetro, enquanto que o grupo CF apresentou redução de 7,5%. Assim, foi evidenciada diferença significativa entre os grupos (Interação  $p=0,0233$  e PP  $p=0,0267$ ), pois a dosagem média de hemoglobina foi significativamente maior no grupo CF+PP do que no grupo CF ( $p=0,0178$ , teste *Tukey*), o que sugere o efeito protetor da *P. pastoris* contra a ação da deletéria da CF neste parâmetro (Tabela 1 e Figura 2B).

Para o hematócrito, não foi observada diferença significativa entre o comparativo inicial e final, embora tenha sido observado um aumento de 6,8% nesse parâmetro no grupo CF+PP e uma redução de 8% no grupo CF. Além disso, ao analisarmos somente os valores finais, foi observada diferença significativa (PP  $p=0,0073$ , Anova), onde foi observado um valor significativamente maior deste parâmetro no grupo CF+PP quando comparado ao grupo CF ( $p=0,0220$ , teste *Tukey*), indicando efeito positivo do probiótico sobre a ação da CF (Tabela 1 e Figura 2C).

O VCM apresentou diferença significativa ( $p<0,0001$ ) com teste de múltipla comparação entre as contagens iniciais e finais ( $p=0,0004$ , *Bonferroni*) somente no grupo CF, reforçando o efeito deletério do fármaco (Tabela 1 e Figura 2D). Já, para o CHCM, não houve diferença significativa entre grupos bem como no período do experimento (Tabela 1).

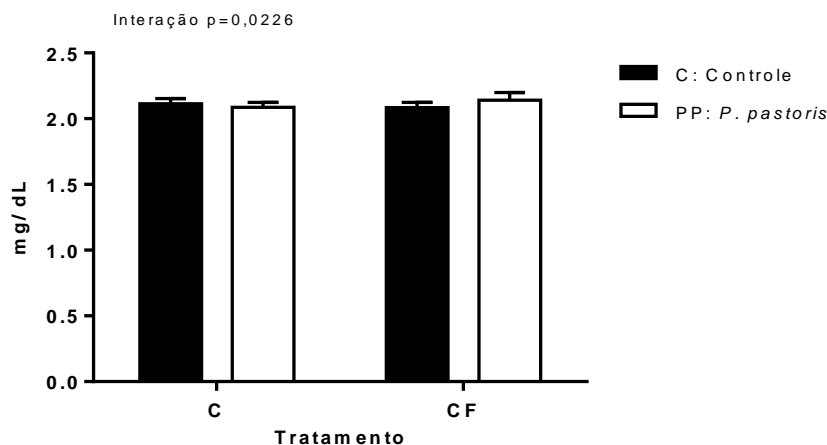


**Figura 2:** Médias da contagem de hemácias (A,  $\times 10^6 \text{cels/mm}^3$ ), dosagem de hemoglobina (B, g/dL) e da porcentagem do hematócrito (C, %) no dia 17 (final) e média do VCM (D, fL) nos dias zero (I=inicial) e 17 (F=final), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (*Tukey*) e no período (*Bonferroni*) ( $n=20$ ).

### 3.3 Parâmetros bioquímicos

Conforme a Tabela 1, em ambos os grupos imunossuprimidos os valores de ureia apresentavam-se acima do recomendado por Matida et al. (2015) (20-65 mg/dL) no dia 17. Além disso, foi observada diferença significativa nos valores de ureia entre os grupos (CF,  $p=0,0054$ , teste Anova) sendo que estes foram significativamente maiores no grupo CF do que nos grupos C ( $p=0,0229$ , teste *Tukey*) e PP ( $p=0,0428$ , teste *Tukey*). Embora não estatisticamente significativo, o grupo tratado com CF que recebeu a suplementação com a levedura demonstrou discreta melhora do que os tratados com CF e não suplementados com PP, ao apresentar valores menores no parâmetro.

Com relação ao perfil lipídico, os valores obtidos ao término do estudo para colesterol total encontravam-se dentro da normalidade para todos os grupos avaliados. No entanto, na análise de variância foi observado que houve uma interação significativa ( $p=0,0214$ , teste Anova) entre o tratamento com CF e a suplementação com o probiótico, onde as médias dos níveis séricos de colesterol dos animais do grupo CF+PP foram significativamente maiores do que as do grupo tratado com CF ( $p=0,0350$ , teste *Bonferroni*) (Tabela 1 e Figura 3). Entretanto, como não foi realizada análise fracionada deste parâmetro, não foi possível determinar se a interação observada é benéfica ou maléfica, ou seja, se foi devido ao aumento do colesterol HDL ou LDL. Em contraponto, conforme demonstrado na Tabela 1, os níveis séricos de triglicerídeos estavam acima do proposto por Santos et al. (2016) (70-150 mg/dL) para todos os grupos, apresentando diferença significativa nos grupos que receberam CF ( $p=0,0371$ ). Em relação aos níveis de glicose, os grupos que receberam o probiótico (PP=220,59±35,82 e CF+PP=214,62±40,58 mg/dL) apresentaram níveis acima do valor de referência preconizado por Santos et al. (2016) (130-210 mg/dL), não sendo observadas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).



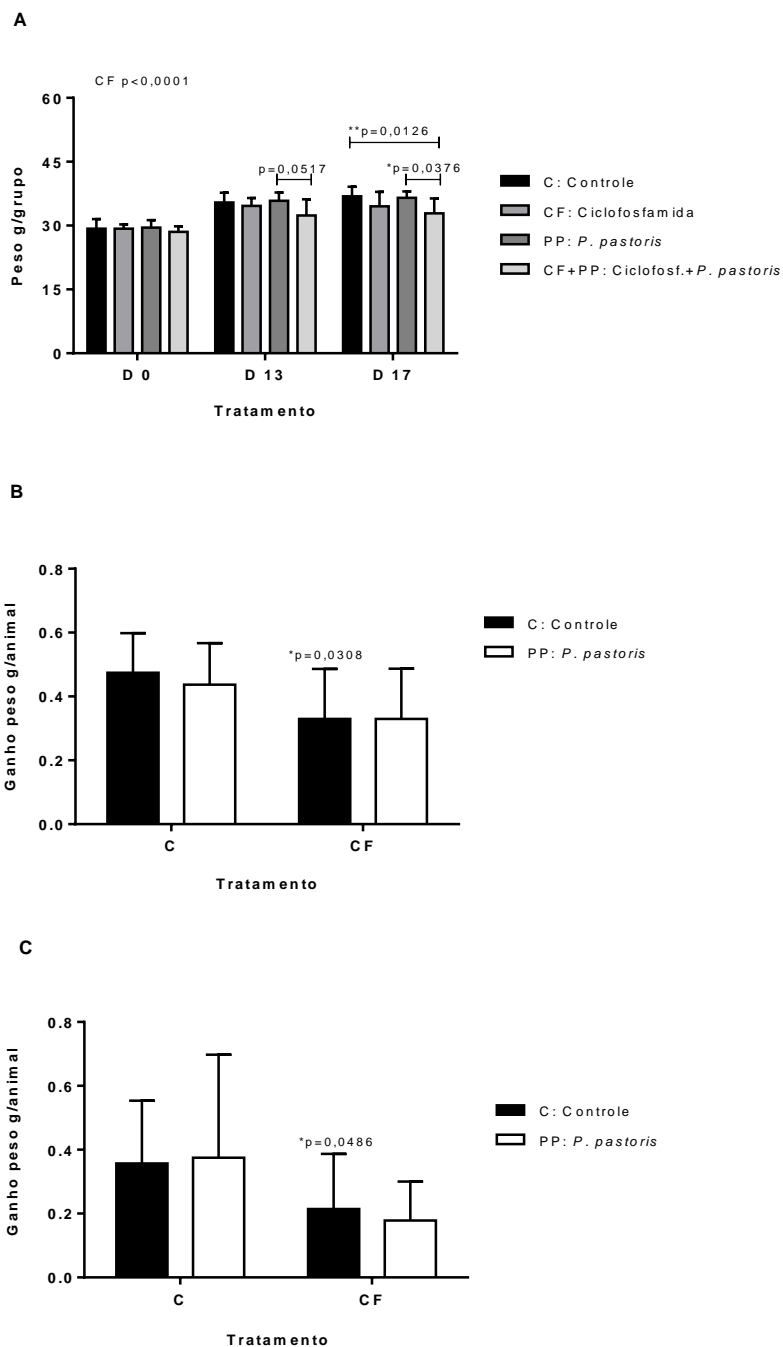
**Figura 3:** Médias dos níveis séricos de colesterol total no dia 17 (final), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C), CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p<0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova e teste de *Bonferroni* ( $n=29$ ).



### 3.4 Peso, consumo alimentar, índice de conversão alimentar e índice de eficiência alimentar

Os animais de todos os grupos ganharam peso significativamente do dia zero ao dia 13 e do dia zero ao dia 17 ( $p < 0,0001$ , teste *Bonferroni*). No dia 13, antes da primeira aplicação de CF, não foi observada diferença significativa entre os grupos com relação ao peso dos camundongos. E no dia 17 foi observada diferença significativa somente entre os grupos C vs CF+PP ( $p = 0,0126$ , teste *Tukey*) e entre os grupos PP vs CF+PP ( $p = 0,0376$ , teste *Tukey*), o que sugere que *P. pastoris* não foi capaz de evitar o déficit no ganho de peso dos animais tratados com o fármaco. Entretanto, o peso dos animais tratados com CF e suplementados com PP no dia 13 foi inferior ao dos outros grupos ( $p = 0,0517$ ), motivo este que pode justificar a ocorrência da diferença significativa entre os grupos C e PP com relação ao grupo CF+PP, e não entre os mesmos grupos e o grupo CF (Tabela 2 e Figura 4A).

Observou-se ainda, que ao final do experimento, o ganho de peso foi significativamente inferior nos grupos tratados com CF (suplementados com probiótico ou não) tanto do dia zero ao dia 17 ( $p = 0,0308$ ), quanto do dia 13 ao 17 ( $p = 0,0486$ ), ou seja, PP não foi capaz de evitar esse déficit no ganho de peso. Já o peso dos animais saudáveis alimentados com a levedura foi semelhante ao do grupo C (Figuras 4B e 4C).



**Figura 4:** Peso (A, g/grupo) nos dias zero, 13 e 17, ganho de peso por dia (B, g/animal) entre os dias zero e 17 (período total do experimento) e ganho de peso por dia (C, g/animal) entre os dias 13 e 17 (período de imunossupressão), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (*Tukey*) ( $n=29$ ).

Em se tratando do consumo de ração, os animais suplementados com o probiótico consumiram uma quantidade significativamente menor de ração, mesmo antes do tratamento com a CF (C vs PP  $p=0,0546$ , C vs CF+PP  $p=0,0388$ , CF vs PP  $p=0,0109$  e CF vs CF+PP  $p=0,0066$ , teste *Tukey*), porém, mesmo assim, não houve diferença significativa nos seus pesos, comparados aos grupos não suplementados com PP (dia 13), resultado que demonstra uma melhor conversão alimentar desses grupos, confirmada pelo menor ICA e pelo maior IEA obtidos pelo grupo PP no período (Tabela 2).

Após o tratamento com o fármaco (dia 17), o consumo de ração foi significativamente maior no grupo controle do que nos outros 3 grupos ( $p<0,0001$ , teste *Tukey*) (Tabela 2 e Figura 5A). Entretanto, com relação ao peso, não foi observada diferença significativa entre o peso dos animais suplementados com PP e do grupo C, que consumiu significativamente mais ração. Assim, novamente esses resultados sugerem uma melhor conversão alimentar dos animais saudáveis suplementados com a levedura do que dos não suplementados (grupo C), confirmada pelo menor ICA e pelo maior IEA obtidos pelo grupo PP no período (Tabela 2).

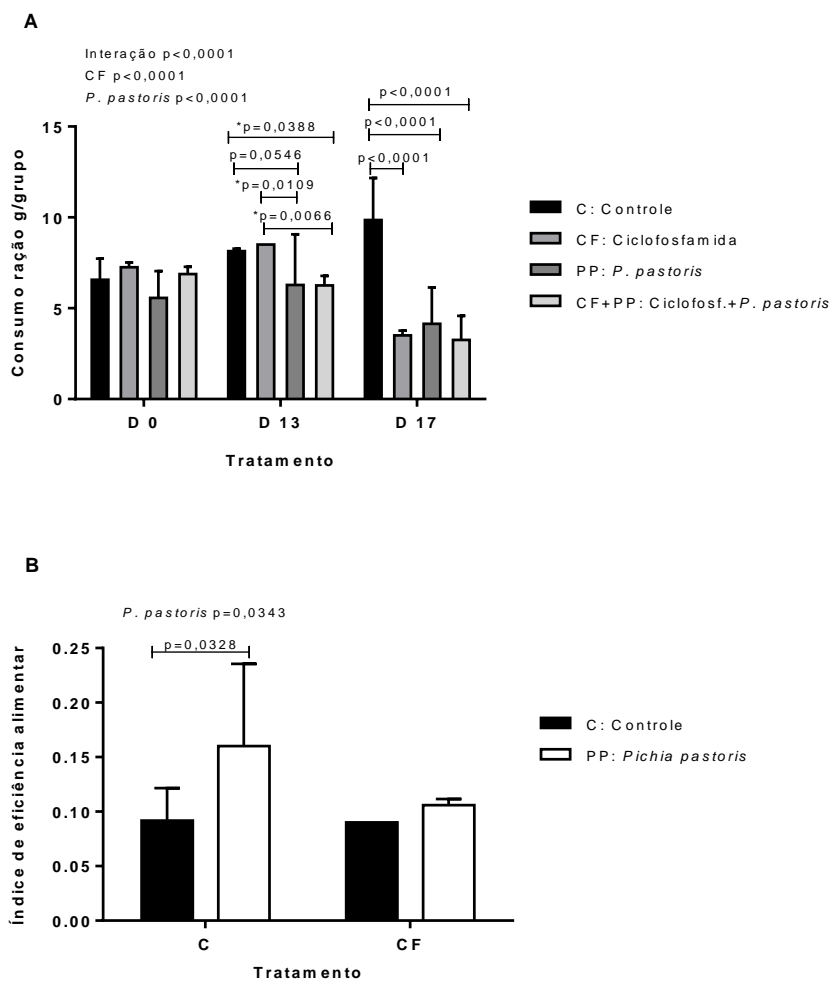
Na fase inicial (dia zero ao 13) e ao longo do estudo (dia zero ao 17), apesar de não significativo, os valores de ICA e IEA foram melhores no grupo saudável que recebeu a suplementação com o probiótico. E na fase imunossupressora (dia 13 ao 17), os valores do ICA nos grupos suplementados, além de menores, apresentaram diferença significativa, sendo estatisticamente menores no grupo CF+PP do que no grupo CF ( $p=0,0028$ , teste T). Além disso, em relação ao IEA, na fase imunossupressora, os valores nos grupos que receberam a levedura, além de maiores, apresentaram diferença significativa ( $p=0,0343$ , Anova), sendo estatisticamente maior no grupo PP do que no grupo C ( $p=0,0328$ , teste *Bonferroni*) (Tabela 2 e Figura 5B).

**Tabela 2:** Médias  $\pm$  desvio padrão do peso por animal e consumo diário de ração por grupo, de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C), no dia zero (doze dias antes da 1ª dose de CF), dia 13 (dia da 1ª aplicação da CF) e dia 17 (após a 2ª dose de CF), e índices de conversão alimentar (ICA) e de eficiência alimentar (IEA) nos períodos avaliados ( $n=29$ ). Valores de  $p<0,05$  são identificados por letras maiúsculas para análise de variância (Two-way Anova),

testes de múltipla comparação são identificados por \* (*Tukey*, entre grupos),  $\alpha$  (*Bonferroni*, entre períodos) e  $\omega$  (teste T).

Grupos	Médias dos valores encontrados no período (g $\pm$ desvio padrão)			Dia 0 – 13		Dia 13 – 17		Dia 0 – 17	
	Dia 0 <sup>a</sup>	Dia 13 <sup>a</sup>	Dia 17 <sup>a</sup>	ICA	IEA	ICA	IEA	ICA	IEA
<b>Controle</b>									
Peso	29,29 $\pm$ 1,55	35,43 $\pm$ 1,80	36,86 $\pm$ 1,88*						
Consumo	6,57 $\pm$ 1,06	8,14 $\pm$ 0,12**	9,86 $\pm$ 2,12***	8,04	0,14	12,19	0,09	6,12	0,17
<b>CF</b>									
Peso	29,25 $\pm$ 0,75 <sup>A</sup>	34,63 $\pm$ 1,38 <sup>B</sup>	34,50 $\pm$ 2,63						
Consumo	7,25 $\pm$ 0,25	8,50 $\pm$ 0,00****	3,50 $\pm$ 0,25	9,73	0,11	10,68 <sup><math>\omega</math></sup>	0,08	10,0	0,15
<b>PP</b>									
Peso	29,50 $\pm$ 1,50	35,83 $\pm$ 1,28	36,50 $\pm$ 1,17*****						
Consumo	5,57 $\pm$ 1,35	7,33 $\pm$ 0,22	4,83 $\pm$ 0,78	6,78	0,16	7,74	0,16 <sup>C<sub>uu</sub></sup>	5,00	0,22
<b>CF+PP</b>									
Peso	28,50 $\pm$ 1,00	32,38 $\pm$ 2,78	32,88 $\pm$ 2,66						
Consumo	6,88 $\pm$ 0,38	6,25 $\pm$ 0,50	3,25 $\pm$ 1,25	11,98	0,12	9,35**	0,11	8,69	0,18

<sup>A</sup> D0 x D17 p=0,0308; <sup>B</sup> D13 x D17 p=0,0486; <sup>C</sup> p=0,0343 (Anova); \* C x CF p=0,0126; \*\* C x CF+PP p=0,0388; \*\*\* C x CF, PP e CF+PP p<0,0001; \*\*\*\* CF x PP p=0,0109 e CF x CF+PP p=0,0066; \*\*\*\*\* PP x CF+PP p=0,0376; <sup>a</sup> p<0,0001 <sup>uu</sup> C x PP p=0,0328;  <sup>$\omega$</sup>  CF x CF+PP p=0,0028.



**Figura 5:** Consumo diário de ração (A, g/grupo) nos dias zero, 13 e 17 e índice de eficiência alimentar (B), entre os dias 13 e 17, de camundongos Swiss machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (*Tukey*) ( $n=29$ ).

### 3.5 Estresse Oxidativo

#### 3.5.1 TBARs

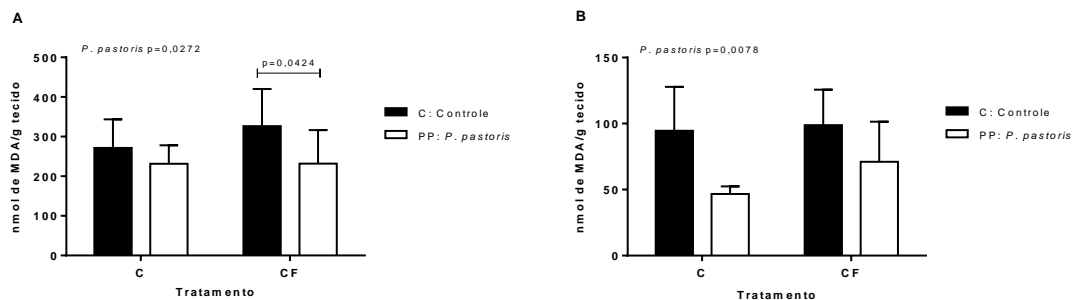
Conforme demonstrado na Tabela 3 e Figura 6A, foram observados valores médios de níveis de TBARs significativamente menores nos rins ( $p=0,0272$ , Anova) nos grupos que receberam o probiótico, onde o grupo CF+PP apresentou níveis significativamente menores que o grupo CF ( $p=0,0424$ , teste T). No fígado, também constatou-se diferença significativa (CF  $p=0,0124$  e PP  $p=0,0093$ , teste Anova), entretanto, os níveis de TBARs foram significativamente

maiores no grupo CF+PP do que no grupo CF ( $p=0,0027$ ), indicando que a levedura não foi capaz de proteger o órgão da ação deletéria do quimioterápico, piorando o quadro. Quanto ao encéfalo, embora não significativo, foi identificada uma menor peroxidação lipídica nos animais tratados com CF e suplementados com a *P. pastoris*, podendo, também, ser verificado melhores níveis, não significativos, nos grupos que receberam a PP, quando comparados ao grupo controle (Figura 6B).

**Tabela 3:** Médias  $\pm$  desvio padrão de concentrações finais (dia 17) dos marcadores de estresse oxidativo TBARS e catalase, por tecido por grupo, de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C) ( $n=29$ ). Valores de  $p<0,05$  são identificados por letras maiúsculas para análise de variância (Two-way Anova) \* para teste de múltipla comparação (*Tukey*, entre grupos) e  $\omega$  (*teste T*).

Marcadores de Estresse oxidativo / tecido	Médias dos valores encontrados nos grupos ( $\pm$ desvio padrão)			
	Controle	CF	PP	CF+PP
<b>Rim</b>				
TBARS (nmol de MDA/g)	271,37 $\pm$ 56,98	326,51 $\pm$ 65,77	231,56 $\pm$ 33,91 <sup>A</sup>	231,86 $\pm$ 75,31 <sup><math>\omega</math></sup>
Catalase (UCAT/mg)	5,40 $\pm$ 0,61 <sup>*</sup>	2,50 $\pm$ 0,57 <sup>C</sup>	3,45 $\pm$ 0,79 <sup>B</sup>	2,27 $\pm$ 0,67 <sup>A</sup>
<b>Fígado</b>				
TBARS (nmol de MDA/g)	102,86 $\pm$ 24,75	142,98 $\pm$ 39,27 <sup>A**</sup>	144,26 $\pm$ 44,07 <sup>B</sup>	202,21 $\pm$ 43,14
Catalase (UCAT/mg)	5,78 $\pm$ 1,76 <sup>***</sup>	2,56 $\pm$ 0,79 <sup>C</sup>	6,34 $\pm$ 1,73 <sup>****</sup>	3,50 $\pm$ 1,14
<b>Cérebro</b>				
TBARS (nmol de MDA/g)	80,31 $\pm$ 32,88	69,73 $\pm$ 16,91	67,70 $\pm$ 9,20	55,43 $\pm$ 6,46
Catalase (UCAT/mg)	9,66 $\pm$ 3,58 <sup>*****</sup>	7,63 $\pm$ 3,33 <sup>A</sup>	2,84 $\pm$ 1,28 <sup>B</sup>	7,95 $\pm$ 2,46 <sup>A</sup>

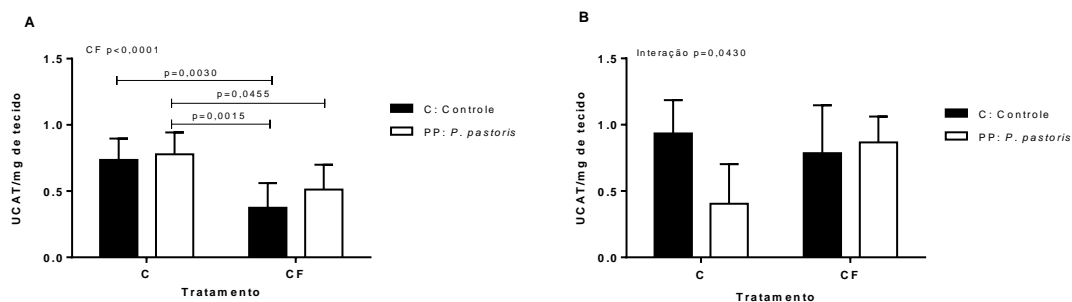
<sup>A</sup>  $p<0,05$ ; <sup>B</sup>  $p<0,01$ ; <sup>C</sup>  $p<0,001$ ; <sup>\*</sup> C x CF  $p<0,0001$ , x PP  $p=0,0101$ , x CF+PP  $p<0,0001$ ; <sup>\*\*</sup> CF x CF+PP  $p=0,0027$ ; <sup>\*\*\*</sup> C x CF  $p=0,0030$ ; <sup>\*\*\*\*</sup> PP x CF  $p=0,0015$ , x CF+PP  $p=0,0455$ ; <sup>\*\*\*\*\*</sup> C x CF  $p=0,0050$ , x PP  $p=0,0036$ , x CF+PP  $p=0,0011$ ;  <sup>$\omega$</sup>  CF x CF+PP  $p=0,0424$ .



**Figura 6:** Níveis de TBARS (nmol de MDA/g de tecido) no rim (A) e encéfalo (B) no dia 17 (final, um dia após a 2ª dose de CF), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como médias  $\pm$  desvio padrão e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) são representadas por \*, utilizando o teste Two-way Anova e Tukey (B) ( $n=29$ ).

### 3.5.2 Catalase

A observação de níveis elevados de atividade da enzima catalase demonstra uma redução no estresse oxidativo celular, fato este detectado no presente estudo, sendo verificadas diferenças significativas no fígado (CF,  $p < 0,0001$ , Anova), onde os valores foram significativamente maiores nos grupos C ( $p=0,0030$ , teste *Tukey*) e PP ( $p=0,0015$ , teste *Tukey*) quando comparados ao grupo CF e, no grupo PP em relação ao CF+PP ( $p=0,0455$ , teste *Tukey*), indicando o efeito nocivo da CF sobre esse parâmetro. Entretanto, não foi observada diferença significativa dos níveis de atividade da catalase entre o grupo CF+PP e C, o que sugere que possa ter ocorrido discreta proteção do órgão pelo uso do probiótico (Tabela 3 e Figura 7A). Nos órgãos rins e encéfalo também foram encontradas diferenças significativas (Interação  $p=0,0436$ , CF  $p < 0,0001$  e PP  $p=0,0059$  nos rins e Interação  $p=0,0209$ , CF  $p=0,0118$  e PP  $p=0,0030$  no encéfalo), sendo as médias dos níveis de atividade dessa enzima significativamente maiores no grupo C quando comparadas às médias dos demais grupos (PP, CF e CF+PP), o que indica que a levedura não foi capaz de proteger os animais da ação do quimioterápico (Tabela 3 e Figura 7B).



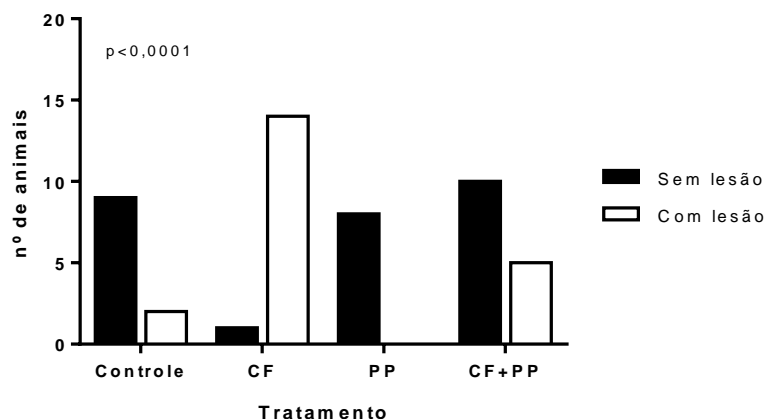
**Figura 7:** Níveis de catalase (UCAT/mg de tecido) no fígado (A) e encéfalo (B) no dia 17 (final, um dia após a 2ª dose de CF), de camundongos *Swiss* machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Os dados são representados como média  $\pm$  desvio padrão em Log e as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas utilizando o teste Two-way Anova, com análise multivariada para determinação das diferenças entre os grupos (Tukey) ( $n=29$ ).

### 3.6 Análise histopatológica

A levedura não atuou como micro-organismo oportunista nos animais, pois não causou mortes nos grupos suplementados com ela. Ressalta-se ainda, que nenhum dos animais que recebeu a suplementação com o probiótico apresentou quaisquer alterações histopatológicas nos rins e fígados, indicando a segurança da utilização da levedura. Além disso, durante a eutanásia não foram observadas alterações macroscópicas nos demais órgãos deste grupo.

Na avaliação da ocorrência de lesões renais, nos animais tratados com CF, foi evidenciado que o probiótico foi eficaz ao evitá-las, pois apenas 33% dos animais do grupo CF+PP apresentaram alterações no órgão (degeneração tubular e presença de cilindros hialinos no túbulo contornado distal), enquanto que no grupo que recebeu apenas o fármaco, 93,3% dos animais avaliados obtiveram lesões (degeneração tubular, foco de fibrose e leucocitose vascular) ( $p < 0,0001$ , teste exato de Fisher) (Figura 8). Em relação à ocorrência de lesões hepáticas, ambos os grupos que receberam o quimioterápico apresentaram alterações histológicas como: foco leucocitário portal, leucocitose vascular e hiperplasia das células de *Kupffer*, não sendo encontradas diferenças significativas entre os grupos (dados não apresentados).





**Figura 8:** Número de animais com e sem lesão renal no dia 17 (um dia após a 2ª dose de ciclofosfamida - CF), de camundongos Swiss machos tratados com ciclofosfamida (CF), suplementados diariamente com *P. pastoris* (PP), tratados com ciclofosfamida e suplementados diariamente com *P. pastoris* (CF+PP) e não tratados e não suplementados (controle, C). CF foi administrada em duas doses, nos dias 13 (150 mg/kg) e 16 (100 mg/kg), via intraperitoneal. Foi utilizado teste exato de Fischer para determinação das diferenças significativas  $p < 0,05$  ( $n=29$ ).

#### 4. Discussão

A ciclofosfamida apresenta-se como um agente alquilante capaz de desencadear mielossupressão, cujas alterações mais comumente observadas são leucopenia, trombocitopenia e anemia (Ferdinandi & Ferreira, 2009; Ferreira et al., 2013).

No presente estudo, seguindo os parâmetros descritos por Santos et al. (2016), observou-se que o probiótico *P. pastoris* apresentou-se eficaz, uma vez que ao final do estudo, foi observada a manifestação de leucopenia e neutropenia apenas no grupo CF, indicando que a suplementação com a levedura a *P. pastoris* não foi capaz de evitar o efeito nocivo do quimioterápico nestes parâmetros.

No estudo de Bujalance et al. (2007), que também utilizou o protocolo proposto por Zuluaga et al. (2006), em camundongos BALB/c fêmeas com 42 dias de idade, os animais receberam suplementação diária, por gavagem, de leite desnatado contendo  $10^9$  UFC/ml de *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) 10 dias antes da primeira injeção intraperitoneal de CF (150mg/kg), objetivando melhorar os efeitos da supressão induzida pelo medicamento, após uma dose total de 250mg/kg de CF. Porém, os grupos que receberam o probiótico não

apresentaram alterações nos parâmetros imunológicos (contagem de leucócitos), tanto o dos animais imunossuprimidos quanto o dos animais saudáveis. Da mesma maneira, a prevenção da leucopenia ocasionada pelo uso de uma única dose de 450mg/kg de 5-fluoracil não foi evidenciada em camundongos *Swiss* machos com 21 dias de idade, que receberam por três dias a quantidade de  $10^9$  UFC/ml da levedura *S. boulardii* (Justino et al., 2014), assim como no presente estudo, na R1. Narcizo et al. (2014) também não observaram alterações significativas na contagem de leucócitos de 24 ratos *Wistar* machos saudáveis, suplementados através da água de beber, por 30 dias, com  $10^5$  UFC/ml de *L. rhamnosus*. Diferentemente do observado na literatura, no presente estudo, onde os animais receberam  $10^8$  UFC/animal da levedura *P. pastoris* por gavagem, por 17 dias (12 dias antes do início da imunossupressão), houve uma melhora significativa nos parâmetros imunológicos leucócitos, neutrófilos e linfócitos dos grupos que receberam o probiótico em comparação aos animais imunossuprimidos e em comparação aos animais saudáveis, sinalizando uma ação positiva do uso do probiótico.

Proteção contra a imunossupressão causada por um única dose intraperitoneal de 150mg/kg de CF no 10º dia, também foi avaliada com a suplementação, 2 dias antes, de  $10^9$  UCF/animal de *L. casei* 431 e 5 dias antes, de  $10^8$  UFC/animal de *L. rhamnosus* 1506 em camundongos *Swiss* machos com 42 dias de idade por Salva et al. (2014). Os autores relatam que as contagens de leucócitos e neutrófilos nos grupos que receberam os micro-organismos foram similares às do grupo CF, contudo, foi verificado que a recuperação da depleção celular foi mais rápida nos animais que receberam os *Lactobacillus*. Tal efeito poderia ter ocorrido no presente estudo, caso o experimento tivesse continuado.

A análise do leucograma do presente estudo identificou a manifestação nociva da CF nos grupos, por meio de leucopenia e neutropenia leves, confirmando, assim, a imunossupressão dos animais, apesar de não haverem sido verificadas reduções expressivas na contagem de plaquetas. Todavia, diferentemente de outros estudos (Zuluaga et al., 2006; Bujalance et al., 2007; Salva et al. 2014), não foi observada diferença significativa dessa contagem antes e após o tratamento com CF.

Chiquieri et al. (2007) avaliaram a leucometria e bioquímica sanguínea de 40 suínos machos saudáveis, tratados por 120 dias com o antibiótico Nitrovim (0,02%), o prebiótico mananoligossacarídeo (0,1%), o probiótico *S. cerevisiae* (0,05%) e o simbiótico *S. cerevisiae* (0,05%) e mananoligossacarídeo (0,1%) adicionados à ração, uma vez que a caracterização destes parâmetros é considerada uma forma indireta de analisar a eficácia de promotores de crescimento. Apesar de não terem sido observados efeitos significativos dos tratamentos sobre os parâmetros estudados, os índices de hemoglobina, globulina e proteínas totais foram menores nos animais do grupo antibiótico. Já com relação ao leucograma, a média das contagens de células foi maior no grupo controle, sugerindo que, sem a adição de promotores de crescimento, os animais por tornarem-se mais susceptíveis a patógenos, desenvolveram maior resposta imunológica. Logo, a inclusão de promotores de crescimento seria capaz de modificar a resposta imune, por meio da modulação da microbiota dos animais.

Todo e qualquer agente quimioterápico possui capacidade de afetar a produção de células sanguíneas na medula óssea, através de seu potencial de toxicidade, estabelecendo-se como um efeito colateral do tratamento (Alves et al., 2016; COP, 2018; OC, 2018). Dentre as alterações hematológicas mais comuns encontra-se a anemia, todavia, é necessário salientar que os danos à medula óssea podem ocorrer em diferentes graus, de forma dependente do fármaco, da dose e do tempo utilizado (Ferdinandi & Ferreira 2009; Ferreira et al., 2013). No presente estudo, não foi evidenciada a manifestação de anemia.

Em um estudo realizado com 24 ratos *Wistar* machos, com 28 dias de idade, com uremia induzida por acetaminofeno e suplementados por via oral com  $10^9$  UFC/animal de *Sporosarcina pasteurii* por 21 dias, os níveis de hemoglobina e da contagem de glóbulos vermelhos reduziram significativamente no grupo urêmico em comparação ao controle. Já no grupo urêmico que recebeu a levedura, as concentrações de hemoglobina e a contagem de hemácias apresentaram-se significativamente maiores quando comparadas ao grupo urêmico, equivalendo-se aos níveis do grupo controle. Observou-se ainda, um aumento estatisticamente significativo nos níveis de hemoglobina do grupo

tratado apenas com o probiótico, indicando uma ação positiva do *S. pasteurii* no sistema hematopoiético (Mandal et al., 2013).

Corroborando com o evidenciado por Robles-Huaynate et al. (2014) e por Mandal et al. (2013), no presente estudo, as concentrações plasmáticas de hemácias e hemoglobina e o hematócrito apresentaram-se maiores, acarretando alterações significativamente positivas entre os animais imunossuprimidos que receberam a suplementação com a levedura *P. pastoris*. Contudo, tais resultados diferem dos obtidos por Zhou et al. (2000) que, ao testarem a segurança da utilização das bactérias ácido lácticas *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20E) ( $10^7$  UFC/dia), *L. acidophilus* HN017 ( $10^9$  UFC/dia) e *Bifidobacterium lactis* HN019 ( $10^{10}$  UFC/dia), através da ocorrência de efeitos adversos em camundongos BALB/c machos, saudáveis, com 42 dias de idade, com suplementação diária via oral por 30 dias, não observaram quaisquer alterações nas contagens hematimétricas de hemácias, hemoglobina, VCM, plaquetas ou outros parâmetros hematológicos, encontrando-se estes, com valores similares aos encontrados no grupo controle, indicando que as cepas, apesar de seguras, não apresentam benefícios na modulação destes parâmetros.

Em um estudo realizado por 15 dias com camundongos C57BL/6 fêmeas, saudáveis, com 56 dias de idade e suplementadas por gavagem nos quatro primeiros dias com *Lactococcus lactis* ( $10^8$  UFC/ml), resveratrol (100mg/kg) e *L. lactis* ( $10^8$  UFC/ml) e resveratrol (100mg/kg) e, nos 11 dias restantes apenas com resveratrol (100mg/kg), foi verificado um aumento significativo na glicemia de jejum ( $99 \pm 43,21$  mg/dL) no grupo que recebeu dieta padrão e o probiótico, quando em comparação ao grupo cuja adição de resveratrol foi realizada (Brito 2015). Em outro estudo, observou-se que a concentração de  $10^8$  UFC/kg de ração de *B. cereus Toyoi*, administrada por 28 dias, em camundongos Swiss machos diabéticos, diminuiu os níveis sanguíneos de glicose e triglicerídeos, quando comparados ao grupo diabético que não recebeu a suplementação, sugerindo que este micro-organismo pode ser utilizado como um tratamento adjuvante nesta patologia (Bampi, 2015).

Já Núñez et al. (2014) avaliaram os marcadores sanguíneos glicose, TG, colesterol total, LDL e HDL em camundongos BALB/c fêmeas que receberam

por 60 dias  $10^8$  UFC/ml de *L. casei* CRL 431 adicionadas à água, após a indução de obesidade por dieta hiperlipídica (5 dias) e constataram que os níveis de glicose nos camundongos obesos não foram alterados pela suplementação com o probiótico, sendo o grupo obeso que recebeu somente o leite fermentado o único a apresentar redução significativa na concentração sérica de glicose, em comparação aos demais grupos com obesidade induzida, porém, os valores obtidos foram superiores aos encontrados no grupo controle. Todavia, os dados encontrados no presente estudo divergem do evidenciado na literatura, tendo em vista que os animais que receberam *P. pastoris* apresentaram, ainda que não significativo, maiores concentrações séricas de glicose em relação ao padrão de referência, resultado que pode ser positivo segundo Chiquieri et al. (2007) na utilização da levedura como promotor de crescimento, devido à participação da glicose no metabolismo energético. Já em relação ao perfil lipídico, Núñez et al. (2014) relatam que, em comparação ao grupo controle, os níveis de TG aumentaram de forma significativa nos animais saudáveis que receberam *L. casei* CRL 431 e que todos os grupos obesos também demonstraram aumento significativo nos valores de TG. No entanto, em comparação ao grupo obeso, a adição do probiótico neste grupo foi capaz de promover redução significativa da concentração deste parâmetro, apesar dos valores serem inferiores ao observado no grupo controle. Tal comportamento não foi observado no presente estudo pois todos os grupos apresentaram níveis séricos de TG acima do preconizado, sendo correlacionada diferença significativa somente no grupo que recebeu a CF, onde os níveis foram significativamente menores.

Machado et al. (2003) testaram o efeito do *L. acidophilus* NCFM ( $10^{10}$  UFC/kg de ração) na modulação dos níveis de colesterol sérico de 90 ratos *Wistar* machos, saudáveis, com 28 dias de idade, por 14 dias, após o consumo de uma dieta rica em colesterol e ácido cólico (14 dias de indução de hipercolesterolemia) e não verificaram diferenças significativas nas concentrações médias de colesterol total, LDL e HDL dos animais. Na avaliação dos níveis de colesterol total e fracionado, Núñez et al. (2014) observaram que a suplementação de probiótico nos animais saudáveis não modificou os parâmetros, contudo, houve uma diminuição significativa nas concentrações séricas de colesterol total, LDL e HDL do grupo obeso cujo *L. casei* foi

administrado. Estes resultados diferem do verificado no presente estudo, onde o perfil lipídico encontrado indicou que houve interação positiva da levedura *P. pastoris* com o quimioterápico para o teste de colesterol total, ou seja, as médias dos níveis séricos de colesterol dos animais do grupo tratado com CF e suplementado com *P. pastoris* foram significativamente maiores do que as do grupo tratado somente com CF, apesar dos valores médios estarem dentro da faixa normal do valor de referência utilizado (Santos et al., 2016). Todavia, como não foram realizados testes adicionais para contagem fracionada das lipoproteínas de alta e baixa densidade, não foi possível estabelecer se a interação é considerada benéfica ou maléfica, sendo uma limitação do estudo.

Em estudo comparativo dos efeitos probióticos das cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* sobre os níveis de colesterol de camundongos BALB/c fêmeas, obesas, com 42 dias de idade, Bubnov et al. (2017) constataram que o efeito hipocolesterolêmico dos micro-organismos administrados oralmente por 7 dias, foi cepa dependente, uma vez que o *L. casei* IMV B-7280 ( $10^6$  UFC/ml), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMV B-7281 ( $10^6$  UFC/ml), *B. animalis* VKL ( $10^6$  UFC/ml) e *B. animalis* VKB ( $10^6$  UFC/ml) (separadamente) ou em combinações probióticas, reduziram significativamente o nível de colesterol total do grupo obesidade em comparação ao grupo controle. Os autores destacam ainda que, dentre as bactérias avaliadas, *L. casei* IMV B-7280 foi a que apresentou maior eficiência, pois as concentrações séricas de colesterol obtidas nos ratos obesos foram ainda mais baixas em relação ao controle. Contudo, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMV B-7281 demonstrou comportamento diferente das outras cepas, pois sob sua influência, os animais obesos atingiram níveis significativamente maiores de colesterol, evento este também observado no presente estudo, mesmo que se tratando de animais saudáveis, machos, mais novos (28 dias de idade) e suplementados por um período maior (17 dias).

Apresentando-se como o principal composto nitrogenado não proteico do sangue, a ureia (assim como a creatinina e o ácido úrico) é formada para que o organismo possa eliminar o excesso de nitrogênio. A azotemia é definida como a elevação plasmática destes compostos e, como os rins são os órgãos responsáveis pela excreção dos mesmos, a análise laboratorial de ureia é bastante empregada para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento das

patologias renais (Lima, 2016; Salifu & Batuman, 2018). Rehman et al. (2012) observaram que camundongos *Swiss* machos, com 56 dias de idade, submetidos a tratamento com CF (100 mg/kg administrada em 2 doses de 50 mg/kg num intervalo de 7 dias entre cada dose) apresentaram maiores níveis de nitrogênio ureico e creatinina no sangue, quando comparados ao grupo controle. Valores maiores de ureia no sangue e na urina também foram observados por Davis & Kuttan. (2000) ao testarem a urotoxicidade causada por uma baixa dose de CF (dose única de 27 mg/kg) em camundongos *Swiss* machos. E no presente estudo, como esperado, também se detectou níveis de ureia significativamente elevados no grupo que recebeu a CF (dose total de 250mg/kg), acima dos valores preconizados, reforçando o efeito nocivo do fármaco e a eficácia do protocolo de imunossupressão.

Névoa et al. (2013) analisaram as características bioquímicas de leitões submetidos por 60 dias a dietas com os aditivos: probiótico *S. cerevisiae* (2000 ppm), prebiótico mananoligossacarídeo (extraído da parede celular de *S. cerevisiae*) (1000 ppm), simbiótico *S. cerevisiae* (2000 ppm) + mananoligossacarídeo (1000 ppm) e o antibiótico avilamicina (100 ppm), e não encontraram diferenças significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros pesquisados (ureia, creatinina, ALT, AST, colesterol total e proteínas plasmáticas). Esses dados apoiam o evidenciado no presente estudo, onde não foi observada diferença significativa nos valores plasmáticos de ureia entre os grupos CF e CF+PP, ou seja, a levedura não foi capaz de proteger os animais desses danos deletérios gerados pelo medicamento. Já Mandal et al. (2013), no intuito de avaliar a eficácia de *S. pasteurii* (MTCC 1761) como uma potencial cepa probiótica sobre um modelo animal de indução de uremia causada por acetaminofeno (paracetamol), observaram que, nos animais urêmicos, após a administração oral da bactéria, os níveis sanguíneos de ureia, creatinina e ácido úrico reduziram significativamente, e a necrose glomerular e os danos ao DNA foram minimizados. Entretanto, no presente estudo, além de ter avaliado outro probiótico e em outro modelo animal, foi administrada uma quantidade menor de probiótico ( $10^9$  UFC/animal no estudo de Mandal e  $10^8$  UFC por animal no presente estudo).

Além dos danos mencionados, estudos com animais relatam que a utilização de quimioterápicos é capaz de desencadear a perda de peso (Kanno et al., 2009; Faber et al., 2011; El-Sheik & Rifaai, 2014).

Para avaliar a associação do uso de probióticos em modelos de imunossupressão, Wei et al. (2007), em pesquisa com 60 ratos *Kunming* machos, com 56 dias de idade, imunossuprimidos com 100 mg/kg de CF, não observaram diferenças significativas nos pesos corporais dos animais alimentados via oral, por 30 dias, com a dieta contendo  $5 \times 10^7$  UFC/kg de *L. rhamnosus* ZDY114, dieta contendo 0,5 g/kg de colostro bovino e, também, com a dieta que continha a combinação de *L. rhamnosus* ZDY114 + colostro, quando comparados com a dieta controle. Entretanto, estudo realizado com camundongos *Swiss* machos tratados com uma única dose de 450mg/kg de 5-fluoracil e suplementados com a levedura *S. boulardii* por três dias, identificou que doses elevadas de  $16 \times 10^9$  e  $48 \times 10^9$  UFC/kg, ou seja, doses mais de 100 vezes maiores do que a utilizada no presente estudo ( $10^8$  UFC/animal), possuem a capacidade de reduzir a perda de peso causada pelo quimioterápico (Justino et al., 2014).

Este efeito de redução do peso corporal pela CF não foi observado no presente estudo, tendo em vista que os animais apresentaram ganho de peso nos grupos tratados com CF ao longo do período. Entretanto, o ganho de peso foi significativamente menor nos grupos tratados com CF, quando em comparação aos grupos controle e suplementado com *P. pastoris*, comprovado esse efeito nocivo da CF, porém, mesmo com um período de suplementação superior ao utilizado por Justino et al. (2014), mas com uma dose mais de 100 vezes menor, a *P. pastoris* não foi capaz de evitar esse déficit no ganho de peso.

Suplementos alimentares (prebióticos e probióticos) têm sido estudados com o objetivo de atenuar o número de patógenos no TGI, promovendo a colonização do mesmo com micro-organismos benéficos, melhorando a resposta imune através do equilíbrio redox e o desempenho animal através do estímulo à digestão e absorção de nutrientes (Lange et al., 2010; Celi et al., 2017). Contudo, a suplementação não se faz necessária apenas para a manutenção da saúde, mas também para assegurar a qualidade dos produtos a serem comercializados (Chauhan et al., 2014). Segundo Celi et al. (2017), o conhecimento a respeito da



saúde intestinal, é fundamental para uma adequada conduta no controle das interações animal vs ambiente (fisiologia, saúde, bem-estar, alimentação e desempenho).

Busanello et al. (2015) observaram, no período de creche, uma melhora estatisticamente significativa no consumo diário de ração, ganho de peso e ganho de peso diário, em 72 leitões com 35 dias de idade durante a suplementação com “pool” de *L. spp* e *L. plantarum*, apesar de não haver diferença significativa na conversão alimentar dos grupos no período. No presente estudo, o consumo de ração também foi significativamente menor nos grupos suplementados com a levedura, o ICA foi significativamente menor no grupo tratado com CF e suplementado com PP na fase imunossupressora (dia 13 ao 17) do que no grupo CF, e o IEA foi estatisticamente maior no grupo PP do que no grupo C. Já no estudo de Barros et al. (2008) não foram observadas diferenças significativas quanto ao consumo de ração de leitões suplementados com prebiótico mananoligossacarídeo (1,5 kg/t de ração), probiótico *Bacillus subtilis* 10<sup>10</sup> UFC/g de produto) e a combinação de ambos, na fase de aleitamento, contudo, os grupos que receberam o probiótico apresentaram ganho de peso significativamente maior em relação ao controle. Entretanto, nos estudos de Busanello e de Barros, as doses de probióticos foram maiores do que a do presente estudo.

Pinto et al. (2015), ao avaliarem o desempenho e a uniformidade de larvas de jundiá com quatro dias de idade, suplementadas com 10<sup>9</sup> UFC/g de ração, com as bactérias *P. pastoris*, *S. boulardii* e *B. cereus Toyoi* (isoladamente) em adição à ração durante um período de 21 dias, encontraram melhores índices de peso e comprimento, dados estatisticamente significativos, no grupo que recebeu *B. cereus Toyoi* nas três fases de estudo, quando em comparação aos grupos que receberam os demais probióticos, sinalizando o efeito benéfico do uso de probióticos como promotores de desenvolvimento animal, dados que corroboram com o obtido no presente estudo em relação ao melhor ICA do grupo tratado com CF que recebeu probiótico, quando em comparação com o grupo CF, e ao melhor IEA do grupo PP do que do grupo C. Entretanto, no estudo de Pinto et al. (2015), *P. pastoris* não apresentou bons resultados, fato que pode ser explicado por Lan et al., 2017, que mencionaram que as características das

cepas, sua dosagem e concentração, bem como o desafio ambiental no qual os animais estão inseridos, influenciam diretamente na eficácia dos micro-organismos probióticos uma vez que, sua ação é dose-dependente e cepa-dependente. Observa-se que no presente estudo, embora a dose tenha sido 10 vezes menor que a utilizada por Pinto et al. (2015) ( $10^8$  UFC/animal e  $10^9$  UFC/g de ração, respectivamente), o consumo alimentar dos animais suplementados com a levedura foi melhor, resultado que pode ser atribuído a via de administração utilizada (gavagem) tendo em vista que o controle de perda de células viáveis e de contaminação do cultivo, é mais eficaz neste modelo, com dosagem única diária, do que no utilizado no estudo do referido autor (ração). Além disso, quando o probiótico é adicionado à ração, existe um maior viés na mensuração do número de células ingeridas devido à perdas (justificando o uso de concentrações elevadas de UFC/g), diferentemente da administração do micro-organismo por gavagem, quando ocorre maior segurança na dose ofertada, motivo este, que explicaria porque a conversão alimentar foi melhor no presente estudo.

Gil de Los Santos et al. (2012) também constataram bons resultados em um estudo que avaliou o ganho de peso em frangos de corte, onde os animais que receberam  $1 \times 10^6$  g de células viáveis de *P. pastoris* por 49 dias, tanto na forma selvagem, como recombinante, contendo o gene da toxina  $\alpha$  de *C. perfringens*, apresentaram ganho de peso superior ao grupo controle. Os autores observaram ainda que a conversão alimentar em ambos os grupos tratados com a levedura *P. pastoris* apresentou melhores índices, uma vez que o grupo que recebeu a forma recombinante da levedura consumiu 8,9% a menos de ração que o grupo controle para atingir o mesmo peso final, seguido do consumo de 6,6% da levedura na forma selvagem. Na avaliação de frangos de corte tratados por 21 dias com  $10^7$  UFC/g de ração de *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* + bacteriocina, *Lactobacillus* e a associação dos três, Chen et al. (2017) obtiveram resultados significativamente positivos na conversão alimentar de todos os grupos (exceto o tratado apenas com *Lactobacillus*) em comparação ao controle, mesmo sem diferença significativa no ganho de peso dos grupos.

As intervenções nutricionais vêm sendo descritas como parte integral e fundamental da terapia do câncer, tendo em vista que a prevenção da perda de

peso involuntária é um dos pontos cruciais a ser considerado (Senesse et al. 2008). Para proporcionar uma melhora nos resultados clínicos e, na qualidade de vida dos pacientes, estudos relatam que os benefícios da suplementação oral, abrangem desde à toxicidade do TGI ao aumento da resposta imune (Van-Cutesem & Arends, 2005; Faber et al., 2011) pois os ingredientes, nutrientes e aditivos ingeridos são capazes de influenciar o desenvolvimento e a funcionalidade do sistema digestivo, imunológico e da microbiota do indivíduo (Celi et al., 2017 *apud* Conway, 1994). A utilização de leveduras como probióticos tem sido relacionada principalmente devido aos componentes da parede celular (mananos e glucanos), que são capazes de sensibilizar o micro-organismo e permitir sua funcionalidade probiótica e/ou transportadora de vacina, tendo em vista que o mananoligossacarídeo (bastante empregado como prebiótico) é capaz de modular o equilíbrio gastrointestinal beneficemente além de estimular a resposta imune (Spring et al., 2000; Shashidhara & Devegowda, 2003; Omara et al., 2010), fatores estes, que beneficiariam pacientes em tratamento antineoplásico.

Corroborando com a literatura, no presente estudo, na R2, foi verificado que os animais tratados com CF e suplementados com *P. pastoris* apresentaram um índice de conversão alimentar significativamente melhor (valores mais baixos) do que os animais do grupo CF, indicando que foi preciso uma menor quantidade de ingestão de ração para ganhar 1 kg de peso. Este efeito pode ser de grande valia para indivíduos em tratamento quimioterápico, tendo em vista que alguns dos efeitos colaterais afetam diretamente sua alimentação, tais como: náuseas, vômitos, diarreia e, por consequência, caquexia (Santos et al., 2007; Mccune et al., 2017).

Entretanto, diferentemente do observado pelos autores, em um estudo com frangos de corte com um dia de idade, e com duração de 42 dias, onde os animais foram alimentados com ração específica para aves, adicionada de prebiótico (mananoligossacarídeo 1,5g/kg) e um agente acidificante (6g/kg), foram administrados  $4 \times 10^6$  UCF/animal/dia de *Lactococcus lactis* 847 (grupo controle), *L. delbruecki* 838 e *L. plantarum* 837, isoladamente, na água dos animais nos dias 6, 7, 8, 21, 22 e 23 dias de idade e, foram avaliados peso corporal, consumo e conversão alimentar, não sendo observadas diferenças

significativas para os parâmetros avaliados, avaliando-se ambos micro-organismos, em relação ao controle (Brzóska et al., 2012). Já em um estudo com 3000 pintos de corte de um dia de idade, dividido em duas fases (inicial 1-20 dias e final de 21-40 dias de idade), onde foram adicionados isoladamente à ração  $10^{10}$  UFC/kg de esporos de *B. subtilis* (em ambas as fases),  $2 \times 10^9$  UFC/kg de um “pool” de probióticos (*L. acidophilus*, *L. casei*, *Streptococcus salivarium*, *Streptococcus faecium*, *B. subtilis*, *B. cereus Toyoi* e *S. cerevisiae*) (ambas as fases) e 2mg/kg de antibiótico (bacitracina de zinco) (ambas as fases), foram avaliados o consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar nas fases inicial e final e no período total sendo evidenciado que, apenas na fase inicial, os animais alimentados com dietas contendo probióticos consumiram significativamente menos ração e apresentaram melhor conversão alimentar. No entanto, não foram observadas diferenças estatísticas na fase final e no período total de criação para as variáveis avaliadas (Corrêa et al., 2003), apoiando os resultados do presente estudo.

Quanto ao índice de eficiência alimentar, antes do tratamento com a CF (dia 13) e ao final do estudo (dia 17), o grupo PP apresentou melhores valores (maiores) do que o grupo controle, sendo significativamente melhor no período de imunossupressão (do dia 13 ao 17), indicando que mesmo consumindo menos ração, os animais foram capazes de apresentar melhor ganho de peso. Yalçın et al. (2010) ao determinar os efeitos do autolisado de *S. cerevisiae* (nas concentrações 1, 2, 3 e 4 g/kg de ração) em galinhas poedeiras, com 22 semanas de idade, durante um período de 16 semanas, verificaram que, diferentemente do presente estudo, os tratamentos dietéticos não afetaram significativamente o peso corporal, o consumo de ração. No entanto, a suplementação aumentou significativamente a produção e o peso dos ovos e melhorou a eficiência alimentar, atribuindo-se a melhora do IEA, devido a levedura proporcionar a redução da carga bacteriana patogênica no intestino. Esses dados apoiam o observado em um estudo sobre o efeito do *Lactobacillus sporogenes* realizado por Panda et al. (2008) onde, nas concentrações de 100 e 150 mg ( $6 \times 10^8$  esporos/kg de ração), foi verificado que em galinhas poedeiras com 24 semanas de idade, suplementadas durante 16 semanas, os autores observaram que os animais apresentaram aumento significativo na

produção de ovos e eficiência alimentar. Entretanto, ganho de peso corporal, consumo de ração e peso do ovo não foram influenciados pela suplementação. Ou seja, melhores IEA nos grupos que receberam a gavagem com o probiótico *P. pastoris* sugerem os efeitos benéficos da alimentação com suplementação probiótica na digestão e utilização de nutrientes de animais saudáveis e imunossuprimidos.

Sabe-se que agentes antineoplásicos como a CF promovem aumento do estresse oxidativo, como já evidenciado por diversos autores (Tripathi & Jena, 2010; Abraham & Rabi, 2011; El-Sheikh & Rifaai, 2014). Tal evento ocorre em ocasiões nas quais existe desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes e antioxidantes, com predominância do primeiro (Schneider & Oliveira, 2004).

Em um estudo conduzido com ratos *Wistar* machos adultos que receberam uma única injeção intraperitoneal de 150mg/kg de CF observou-se, nos rins dos animais, um aumento de 52% nos níveis de MDA e 46% nos níveis de GSH em comparação ao grupo controle (Abraham & Rabi, 2011). Outro estudo que avaliou o estresse oxidativo induzido por 50mg/kg de CF em ratos machos adultos que receberam 25mg/kg de astaxantina também constatou que o medicamento induziu, no fígado, um aumento significativo nos níveis de MDA, assim como no presente estudo, e reduziu os níveis de GSH quando comparado ao grupo controle (Tripathi & Jena, 2010). Patra et al. (2012) também verificaram que uma dose reduzida de CF (50mg/kg) aumenta significativamente os níveis de MDA na medula óssea e no fígado de camundongos *Swiss* machos 24 horas após sua aplicação. El-Sheikh & Rifaai (2014), em ratos *Wistar* machos adultos, observaram o mesmo comportamento nos marcadores de estresse oxidativo GSH, óxido nítrico e MDA, onde os níveis encontrados no fígado foram significativamente maiores no grupo que recebeu o fármaco. Observa-se que era esperado que a CF provocasse a peroxidação lipídica nos órgãos avaliados (rim, fígado e encéfalo), uma vez que a dosagem utilizada foi superior (250mg/kg) às referidas nos estudos citados.

Segundo Chen et al. (2013) distintas causas são capazes de desencadear o estresse oxidativo, sendo o uso da terapia probiótica um fator cada vez mais eficaz no auxílio da redução do mesmo. Foi relatado por Ou et al. (2012) que células inativas de bactérias ácido-lácticas são capazes de diminuir *in vitro* o

dano tóxico aos hepatócitos causados pelo tert-butil-hidroperóxido. Esse efeito protetor foi atribuído à redução do risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pela reativação de enzimas antioxidantes.

Em relação ao efeito do probiótico *B. cereus Toyoi* sobre os parâmetros de estresse oxidativo em camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina, Bampi (2015) relatou que o nível do marcador de estresse oxidativo TBARs foi menor nos rins do grupo suplementado com *B. cereus Toyoi* em comparação ao grupo controle, não sendo porém, observadas alterações nos níveis do fígado e encéfalo dos animais, diferentemente do presente estudo, onde a levedura apresentou ação maléfica no fígado, piorando os índices de MDA, dos animais tratados com CF.

A redução plasmática dos níveis de MDA por meio da administração de *L. acidophilus* foi demonstrada por Chen et al. (2013), em estudo realizado com camundongos com doença aterosclerótica progressiva. E Goyal et al. (2013) identificaram que camundongos BALB/c infectados por *Giardia trophozoites* que receberam *L. rhamnosus* também apresentaram uma redução significativa dos níveis de MDA do homogenato. De forma semelhante, no presente estudo verificou-se que *P. pastoris* reduziu significativamente os níveis de MDA nos rins dos animais sadios e imunossuprimidos, em comparação ao grupo controle e ao grupo CF, demonstrando um efeito benéfico no combate à peroxidação lipídica desencadeada pelo fármaco.

Impedir e/ou diminuir os danos ocasionados pela ação nociva dos radicais livres ou dos EROs é a principal função do sistema de defesa antioxidante, e pode ser realizada por meio de diversos mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos como: sistemas de prevenção, varredores ou de reparo (Clarkson & Thompson, 2000; Koury et al., 2003). Logo, por definição, considera-se antioxidante toda e qualquer substância que, presente em concentrações menores que as do substrato oxidável, possua capacidade de retardar e/ou prevenir de forma significativa a oxidação deste substrato (Halliwell & Whiteman, 2004).

As enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), e CAT, por meio de mecanismos de prevenção, são responsáveis por controlar e/ou inibir a formação de radicais livres e espécies não radicais, responsáveis

pelos danos oxidativos no organismo (Ferreira & Matsubara, 1997; Schneider & Oliveira, 2004). Portanto, a análise dos níveis da atividade destas enzimas pode gerar subsídios para mensurarmos o quadro de estresse oxidativo de diferentes sistemas celulares.

Como já mencionado, apesar de muito eficaz, o uso de terapia medicamentosa com CF é limitado, uma vez que o elevado potencial tóxico secundário da droga é capaz de desencadear danos oxidativos através do aumento de marcadores de estresse oxidativo e/ou da depleção da ação das enzimas antioxidantes (Waitzberg, 2006; Sayed-Ahmed, 2010; Faber et al., 2011; Mccune et al., 2017).

Em um estudo conduzido com ratos que mensurou a hepatotoxicidade induzida por CF, El-Sheikh & Rifaai (2014) constataram que houve uma redução significativa da atividade enzimática da SOD, CAT, GPx e glutathione-S-transferase (GST) no grupo que recebeu o fármaco, em comparação ao controle, fato também observado no presente estudo, nos três órgãos avaliados, reforçando a eficiência do protocolo utilizado. Abraham & Rabi (2011) observaram que o nível de catalase nos rins de ratos tratados com CF foi 29% menor quando comparado ao controle, sendo perfeitamente restaurados quando administrada a dose de 200 mg/kg de aminoguanidina. No estudo de Patra et al. (2012), com camundongos *Swiss* machos, a ação deletéria da CF também foi evidenciada através da redução da atividade enzimática da GST e SOD na medula óssea. Entretanto, foi observado um aumento da atividade da CAT no fígado do grupo CF em comparação ao controle, diferentemente do observado no presente estudo, onde somente os grupos de animais saudáveis (C e PP) apresentaram uma atividade significativamente maior da enzima, indicando um menor estresse oxidativo no órgão.

Bampi (2015) avaliaram em camundongos *Swiss* machos, adultos, com DM induzida por estreptozotocina, a capacidade probiótica do *B. cereus Toyoi* (na concentração  $10^8$  UFC/g de ração) sobre a atividade das enzimas GPx e SOD no rim após 28 dias de suplementação, e encontraram resultados que indicam uma proteção do estresse oxidativo gerado no órgão, através de reduzidos níveis de atividade das enzimas nos grupos que receberam a bactéria em comparação ao grupo diabético. Buscando detectar o efeito do micro-

organismo *L. rhamnosus* GG sobre a fibrose hepática em ratos *Wistar* machos, adultos, em modelo animal de doença hepática crônica, Hammes et al. (2017) ofertaram diariamente por gavagem  $2,5 \times 10^7$  UFC do probiótico ao longo de duas semanas e obtiveram uma leve melhora na relação SOD/CAT (redução de 30%), embora não estatisticamente significativa.

Yadav et al. (2018) estudaram, em ratos *Wistar* machos com 56 dias de idade, que receberam dieta hipercolesterolêmica, a capacidade da suplementação com o probiótico *L. fermentum* MTCC, na concentração de  $2 \times 10^9$  UFC/g de ração, promover a melhora na atividade das enzimas CAT, SOD e GPx no fígado e rim dos animais. Foi evidenciado um aumento significativo da atividade das enzimas CAT e SOD no fígado, enquanto que nos rins, apenas a CAT apresentou aumento significativo nos ratos alimentados com a dieta rica em lipídeos e o probiótico, em comparação ao grupo que não recebeu a suplementação. Já para a atividade da GPx, não foram observadas diferenças significativas. Corroborando com o descrito na literatura, no presente estudo a levedura *P. pastoris* demonstrou efeito benéfico somente no fígado dos animais tratados com CF, tendo em vista que os resultados obtidos sinalizam interação significativamente positiva, onde os níveis de atividade da enzima catalase encontravam-se significativamente maiores no órgão dos animais do grupo CF+PP do que no grupo CF.

Há relatos na literatura de que a utilização de quimioterápicos também é capaz de ocasionar toxicidade em órgãos como fígado (Abraham & Rabi, 2011; El-Sheikh & Rifaai, 2014), rins (Abraham & Rabi, 2011) e bexiga (Vieira et al., 2004) dentre outros.

Abraham & Rabi (2011) induziram dano renal em ratos *Wistar* machos por meio de uma única dose de 150mg/kg de CF, suplementando os animais com 200mg/kg de aminoguanidina uma hora antes, para avaliar seu potencial protetor. Os animais foram eutanasiados 16 horas após a aplicação do fármaco, e a análise histológica dos rins sinalizou a presença de lesões, caracterizando nefrite glomerular no grupo CF, enquanto que os rins dos animais do grupo que recebeu a dose de CF e a suplementação com aminoguanidina não apresentaram alterações. Segundo o estudo de El-Sheikh & Rifaai (2014), a análise histológica tanto do fígado dos animais que receberam 150 mg/kg de CF,



quanto daqueles que receberam a mesma dose de CF associada a 150 mg/kg/dia de fenofibrato, apresentaram múltiplos focos de necrose, alterações gordurosas e infiltração glomerular inflamatória, diferentemente do grupo onde foi realizada a administração de CF em associação à 10 mg/kg/dia de pioglitazona, onde foi verificada melhora acentuada na imagem histológica dos órgãos. Resultados semelhantes foram verificados no presente estudo, onde os animais que receberam o quimioterápico apresentaram alterações histológicas no fígado e rins, 24 horas após a segunda dose de CF, totalizando 250 mg/kg.

Alguns pesquisadores já relacionaram a redução de danos hepáticos ao uso de probióticos. Rishi et al. (2011) identificaram que ratos *Wistar* machos com 42 dias de idade e com doença hepática tratados diariamente por gavagem contendo  $10^{10}$  UFC/animal de *L. plantarum* isolado ou em combinação com arginina demonstraram uma redução significativa das alterações histológicas no órgão. Sharma et al. (2012) detectaram também que o probiótico *Enterococcus lactis* ( $10^9$  UFC/mL), administrado por gavagem durante 14 dias, colaborou para a proteção hepática causada em ratos *Wistar* machos, adultos, diante do uso de acetaminofeno, dados estes que diferem do encontrado no presente estudo, onde 24 horas após a aplicação da segunda dose de CF (totalizando 250mg/kg/animal), foram evidenciados danos hepáticos e renais nos grupos que receberam o imunossupressor, sem melhora nas alterações histológicas dos fígados dos animais suplementados com a levedura. Entretanto, foi verificado que houve redução significativa nas lesões renais, no grupo cujo fármaco foi associado com a suplementação diária de  $10^8$  UFC/animal de *P. pastoris*, indicando que a levedura foi capaz de proteger contra a ação nociva da ciclofosfamida neste órgão.

França et al. (2015), no intuito de atestar a segurança da suplementação com *P. pastoris* em camundongos BALB/c machos, saudáveis, com 35 dias de idade observaram que não houveram danos nas microvilosidades e morfologia intestinal, nem na análise histopatológica do fígado e baço, nos animais que receberam  $10^7$  UFC/g da levedura adicionada à ração por 20 dias, ou seja, uma quantidade 10 vezes menor que a ofertada no presente estudo.

Análises histopatológicas de fígado, pulmão, rim, baço, coração, cérebro, pâncreas e intestino grosso de frangos de corte submetidos a suplementação

com *P. pastoris* selvagem e recombinante também foram realizadas por Gil de Los Santos (2012), onde não foram identificadas lesões significativas macro e microscopicamente, tão pouco foi evidenciada quaisquer lesão inflamatória nos grupos. Tais evidências também foram observadas no presente estudo, onde não foram encontradas alterações microscópicas no fígado e rim dos animais suplementados com a *P. pastoris*, bem como, durante a eutanásia, não foram identificadas alterações macroscópicas nos demais órgãos dos animais, reforçando a segurança da suplementação com a levedura em animais saudáveis e imunossuprimidos e assegurando suas propriedades probióticas.

## **5. Conclusão**

Foram observadas alterações significativamente positivas em relação à utilização de *P. pastoris* em modelos de imunossupressão induzida por CF, uma vez que a levedura evitou a leucopenia e a neutropenia. Além disso, uma maior redução nas contagens de leucócitos, neutrófilos e linfócitos, sinalizou uma melhora nas contagens hematimétricas do leucograma. A levedura foi eficaz ao proteger os rins, reduzindo a peroxidação lipídica e prevenindo a ocorrência de lesões no órgão, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica e de aumentar a atividade da enzima catalase no encéfalo, além de ter melhorado a conversão alimentar no grupo que recebeu o fármaco, tornando-se um promissor adjuvante ao tratamento quimioterápico. Ademais, nos animais saudáveis, além de segura, a suplementação foi significativamente benéfica na promoção de melhor eficiência alimentar, aumento dos níveis séricos de leucócitos, linfócitos, hemácias, dosagem de hemoglobina e hematócrito, e reduzindo a peroxidação lipídica nos rins e encéfalo.

## Referências

1. AEBI H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121- 126, 1984.
2. ABRAHAM, P.; RABI, S. Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Redox report*, v. 16, n. 1, p. 8-14, 2011.
3. ALVES, A. A.; SILVEIRA, A. L. S.; NASCIMENTO, K. B. R.; RESENDE, A. B.; SANTOS, T. M. P. Alterações hematológicas em pacientes oncológicos internados em um hospital público de Sergipe. 2º Congresso Internacional de Atividade Física, Nutrição e Saúde – CIAFIS. Universidade Tiradentes. 2016.
4. AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied microbiology Biotechnology*, v. 97, p. 809–817, 2013.
5. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. 2002.
6. BALLOU, M. A. Case study: Effects of a blend of prebiotics, probiotics, and hyperimmune dried egg protein on the performance, health, and innate immune responses of Holstein calves. *The Professional Animal Scientist*. 27 ( 2011 ):262–268.
7. BAMPI, S. R. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyoi*. 2015. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2015.
8. BARROS, D. S.; CARAMORI, J. G. J.; CORRÊA, V. S.; ABREU, J. G.; FRAGA, A. L.; MAINARDI, F.; DUTRA, V. Efeito da adição de probiótico e prebiótico sobre o ganho de peso, consumo de ração e ocorrência de diarreia em leitões na fase de aleitamento. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.9, n.3, p. 469-479, jul/set, 2008.
9. BRITO, J. N. Perfil glicêmico de camundongos tratados com probiótico e resveratrol. 9º Fórum de Ensino Pesquisa, Extensão e Gestão – FEPEG. ISSN 1806-549X.
10. BRZÓSKA, F.; ŚLIWIŃSKI, B.; STECKA, K. Effect of *Lactococcus Lactis* vs. *Lactobacillus* spp. bacteria on chicken body weight, mortality, feed conversion

and carcass quality. *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 12, No. 4 (2012) 549–559, DOI: 10.2478/v10220-012-0046-y

11. BUBNOV, R. V.; BABENKO, L. P.; LAZARENKO, L. M.; MOKROZUB, V. V.; DEMCHENKO, O. A.; NECHYPURENKO, O. V.; SPIVAK, M. Y. Comparative study of probiotic effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* strains on cholesterol levels, liver morphology and the gut microbiota in obese mice. *European Association for Predictive, Preventive and Personalised Medicine (EPMA) 2017*. DOI 10.1007/s13167-017-0117-3.

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

13. BUSANELLO, M.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; CHAMBO, A. P. S.; ECKSTEIN, I. I. Probiotics: viable and inactivated cells on the performance, microflora and blood parameters of piglets. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.16, n.2, p.387-396 abr-jun., 2015

14. CALIXTO-LIMA, L. et al. Dietetic management in gastrointestinal complications from antitumour chemotherapy. *Nutr. Hosp.*, v. 27, n. 1, p. 65-75, 2012.

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

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

17. CELI, P.; COWIESON, A.J.; FRU-NJI, F.; STEINERT, R.E.; KLUENTER, A.M.; VERLHAC, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.09.012>

18. ÇELIK, E.; OZBAY N. E.; ÇALIK P. Use of Biodiesel Byproduct Crude Glycerol as the Carbon Source for Fermentation Processes by Recombinant

*Pichia pastoris*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v 47, p. 2985-2990, 2008.

19. CHAUHAN, S.S.; CELI, P.; PONNAMPALAM, E.N.; LEURY, B.J.; LIU, F.; DUNSHEA, F.R. Antioxidant dynamics in the live animal and implications for ruminant health and product (meat/milk) quality: role of vitamin E and selenium. 2004. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1525-1536.

20. COP – Centro de Oncologia do Paraná –. Efeitos colaterais da quimioterapia. <http://centrodeoncologia.com/noticias/informacoes-para-pacientes/tratamentos/efeitos-colaterais-da-quimioterapia/> 15/07/18

21. CONWAY, P.L. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig, In: Souffrant, W.B., Hagemester, H. (Ed.), *Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, EAAP Publication, Dummerstorf, 1994, pp. 231–240.

22. CHEN, L.; LIU, W.; LI, Y.; LUO, S.; LIU, Q.; ZHONG, Y.; JIAN, Z.; BAO, M. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process. *International Immunopharmacology*, v.17, p. 108-115, 2013.

23. CHEN, C. Y.; CHEN, S. W.; WANG, H. T. Effect of supplementation of yeast with bacteriocin and *Lactobacillus* culture on growth performance, cecal fermentation, microbiota composition, and blood characteristics in broiler chickens. *J Anim Sci* Vol. 30, No. 2:211-220 February 2017.

24. CHIQUIERI, J.; SOARES, R. T. R. N.; HURTADO NERY, V. L.; CARVALHO, E. C. Q.; COSTA, A. P. D. Bioquímica sanguínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.8, n.2, p. 97-104, 2007.

25. CLARKSON PM, THOMPSON HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(2):637-46.

26. CORRÊA, G. S. S.; GOMES, A.V.C.; CORRÊA, A.B.; SALLES, A.S.; MATTOS, E.S. Utilização de antibiótico e probiótico como promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Revista Universidade Rural*, Rio de Janeiro, v.22, n.2, p.75 81, 2003.

27. COSTA, E. S.; VARAVALLA, M. A. Probióticos e prebióticos: relações com a imunidade e promoção da saúde. *Revista Científica do ITPAC.* v.4, n.2, 2011.

28. DAVIS, L.; KUTTAN, G. Effect of *Withania somnifera* on cyclophosphamide-induced urotoxicity. *Cancer Letters* 148 (2000) 9-17.
29. DOU. Diário Oficial da União. Resolução Normativa nº 33, de 18 de novembro de 2016. "Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica" do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Brasil, 2016.
30. DUMMER, L. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; NIZOLI, L. Q.; DE MORAES, C. M.; ROCHA, A. R.; DE SOUZA, L. L.; ROSS, T.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*, v. 161, n. 1, p.84-90, 2009a.
31. DUMMER, L. A.; NIZOLI, L. Q.; ROCHA, A. S. R.; DE MORAES, C. M.; CONCEIÇÃO, F. R.; GIL-TURNES, C.; VIDOR, T.; LEITE, F. P. L. Production and characterization of recombinant bovine herpesvirus type 5 glycoprotein D expressed in *Pichia pastoris*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p.315-316, 2009b.
32. EL-SHEIKH, A. A. K. and RIFAAI, R. A. Rifaai. "Peroxisome Proliferator Activator Receptor (PPAR)-gamma Ligand, but Not PPAR-alpha, Ameliorates Cyclophosphamide- Induced Oxidative Stress and Inflammation in Rat Liver." *PPAR Res.*2014. DOI: 10.1155/2014/626319.
33. FABER, J.; VAN LIMPT, K.; KEGLER, D.; LUIKING, Y.; GARSSSEN, J.; VAN HELVOORT, A.; VOS, A. P.; KNOLS, J. Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia. *Nutrition and Disease*, p. 1292-1298, 2011.
34. FAO - ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Probióticos em los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Roma, 2006.52p.
35. FERDINANDI, D. M.; FERREIRA, A. A. Agentes alquilantes: reações adversas e complicações hematológicas. *AC & Científica*, v. 1, p. 1-12, 2009

36. FERREIRA A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *RAMB*. 1997; 43(1):61-8.
37. FERREIRA, A. L.; ROCHA, C. P. R.; VIEIRA, L. M.; DUSSE, L. M. S.; JUNQUEIRA, D. R. G.; CARVALHO, M. G. C. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. *Rev. Bras. Farm.* 94 (2): 94-101, 2013.
38. FDA US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Guidance for industry and investigators: safety reporting requirements for INDs and BA/BE Studies. Silver Spring, MD. 2012:29. Acesso em 08/08/2014. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/. . /Guidances/UCM227351.pdf>. 2018
39. FRANÇA, R. C.; CONCEIÇÃO, F. C.; MENDONÇA, M.; HAUBERT, L.; SABADIN, G.; OLIVEIRA, P. D.; AMARAL, M. G.; SILVA, W. P.; MOREIRA, A. N. *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella Typhimurium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015. 99:7953–7961
40. GABOARDI, G. C.; ALVES, D.R.; GRIEP, E.; RODRIGUES, A.; FINGER, P.; CONCEIÇÃO, F. R. Suplementação de ração para codornas com *Pichia Pastoris* X-33 produzida em resíduos industriais e o impacto no desempenho zootécnico. *Anais do IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada* ISSN 2237-1672. Porto Alegre-RS, 2016.
41. GIL DE LOS SANTOS, J. R.; STORCH, O. B.; FERNANDES, C. G.; GIL-TURNES, C. Evaluation in broilers of the probiotic properties of *Pichia pastoris* and a recombinant *P. pastoris* containing the *Clostridium perfringens* alpha toxin gene. *Veterinary Microbiology*, 2012. 156:448–451
42. GOYAL, N.; RISHI, P.; SHUKLA, G. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 1049–57, 2013.
43. HAMMES, T. O.; LEKE, R.; ESCOBAR, T. D. C.; FRACASSO, L. B.; MEYER, F. S.; ANDRADES, M. E.; SILVEIRA, T. R. *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces

hepatic fibrosis in a model of chronic liver disease in rats. *Nutr Hosp* 2017; 34:702-709.

44. HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004; 142(2): 231-55.

45. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Manual de boas práticas: exposição ao risco químico na central de quimioterapia: conceitos e deveres / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Rio de Janeiro, 2015.

46. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tratamento do câncer <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento> INCA. Acesso em 19 de março de 2017

47. JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products—challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 175–181, 2010.

48. JUSTINO, P. F. C.; MELO, L. F. M; NOGUEIRA, A. F.; COSTA, J. V. G. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *British Journal of Nutrition*, v. 111, p. 1611–21, 2014.

49. KANNO, T. Y. N.; SENSIATE, L. A.; PAULA, N. A.; SALLES, M. J. S. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 45, n. 2, abr./jun., 2009.

50. KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003.

51. KLAFKE, G. B.; SCHMIDT, G. M.; MOREIRA, G.; PEREIRA, J. L.; OLIVEIRA, P. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; GUERRA, R.; GRASSMANN, O. A.; DELLAGOSTIN, L. S. P. Lectin I from *Bauhinia variegata* (BVL-I) expressed by *Pichia pastoris* inhibits initial adhesion of oral bacteria in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*. DOI <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.062> Aceito em: 16 de setembro de 2016.



52. LAN, R. C.; LEE, S. I.; KIM, I. H. Effects of *Enterococcus faecium* SLB 120 on growth performance, blood parameters, relative organ weight, breast muscle meat quality, excreta microbiota shedding, and noxious gas emission in broilers. *Poultry Science*, Oxford, v. 0, p. 1-8, 2017.
53. LANGE, C.F.M.; PLUSKE, J.; GONG, J.; NYACHOTI, C.M. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livest. Sci.* 2010. 134, 124-134.
54. LIMA, L. M. Exames Bioquímicos: Guia Prático para o Clínico. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.
55. MACHADO, D. F.; FERREIRA, C. L. L. F.; COSTA, N. M. B.; OLIVEIRA, T. T. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido fólico. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 23 (2) 270-275, maio-ago 2003.
56. MACK, M. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. *Protein Expr Purif* 66(2): pp 165-171, 2009.
57. MANDAL, A.; MANDAL, S.; ROY, S.; PATRA, A.; PRDHAN, S.; DAS, K.; PAUL, T.; MONDAL, K. C.; NANDI, D. K. Assessment of efficacy of a potential probiotic strain and its antiuremic and antioxidative activities. *e-SPEN Journal* 8 (2013) e155ee163.
58. MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. (2005) Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. *Rev BioCie Terra* ISSN 1519–5228 5(2):1–13
59. MATIDA, E. T.; ZANCANARO, A. E.; RESTEL, T. I.; GOMES, V. M. W.; BAZZANO, T.; MORI, C. M. C.; TEIXEIRA, M. A. Determinação de Parâmetros Bioquímicos e hematológicos em camundongos (*mus musculus*) do Biotério Central da UFMS. *RESBCAL*, São Paulo, v.3 n.1, pg. 30-35, 2015.
60. MCCUNE, W.J; MACR, M.D; CLOWSE, M. B. General principles of the use of cyclophosphamide in rheumatic diseases. UpToDate. Disponível em: [https://www.uptodate.com/contents/general-principles-of-the-use-of-cyclophosphamide-in-rheumatic-diseases?source=search\\_result&search=ciclofosfamide&selectedTitle=5~150](https://www.uptodate.com/contents/general-principles-of-the-use-of-cyclophosphamide-in-rheumatic-diseases?source=search_result&search=ciclofosfamide&selectedTitle=5~150) Acesso em: 19 de março de 2017.

61. NARCIZO, J.; XIMENEZ, L.; SUMITA, T.; SANTOS, S.; SILVIA, C.; LEO, M. Influência do consumo de *Lactobacillus rhamnosus* nos níveis séricos de IgG e contagem de leucócitos de ratos SPF recém desmamados. *Revista Biociências*, v. 20, n. 1, 2014.
62. NÉVOA, M.L.; CARAMORI, J.G.J.; CORRÊA, G.S.S.; ARANTES, V.M.; KAMIMURA, R.; GONÇALVES, F.C.; OLIVEIRA, M.S.F.; SANTOS, A. L.; NALON, R.P. Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.2, p.447-454, 2013.
63. NIZOLI, L. Q.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, S. S.; DUMMER, L. A.; SANTOS JÚNIOR, A. G.; LEITE, F. P. L. Immunogenicity and antigenicity of the recombinant EMA-1 protein of *Theileria equi* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 18, n. 2, p.1-4, 2009.
64. NÚÑEZ, I.N.; GALDEANO, C.M.; MORENO, L.B.A.; PERDIGÓN, G. Evaluation of immune response, microbiota and blood markers after probiotic bacteria administration in obese mice induced by a high fat diet, *Nutrition* (2014), doi: 10.1016/j.nut.2014.03.025.
65. OC – Onco Center. Alteração nas células do sangue durante a quimioterapia. <http://oncocentermedicos.com.br/site/2015/09/08/alteracao-nas-celulas-do-sangue-durante-a-quimioterapia/> 15/07/18
66. OKAWA, H. NOBUKO, A.; YAGI, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analalitical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979.
67. OMARA, W.A., RASH, B.M.; HAYES, A.; WICKHAM, M.S.; OLIVER, S.G.; STATEVA, L.I. Conditional cell-wall mutants of *Saccharomyces cerevisiae* as delivery vehicles for therapeutic agents in vivo to the GI tract, doi:10.1016/j.jbiotec. 2010.03.010, *J Biotechnol*, 147(2), 136-143 (2010).
68. OU, C.C.; CHIU, Y.H.; LIN, S.L.; CHANG, Y.J.; HUANG, H.Y.; LIN, M.Y. Hepatoprotective Effect of Lactic Acid Bacteria in the Attenuation of Oxidative Stress from tert-Butyl Hydroperoxide. *Journal of food and drug analysis*, v. 20, n. 1, p. 101-110, 2012.
69. PANDA, A. K.; RAO, S. S. R.; RAJU, M. V. L. N.; SHARMA, S. S. Effect of probiotic (*Lactobacillus sporogenes*) feeding on egg production and quality, yolk

cholesterol and humoral immune response of White Leghorn layer breeders. *J Sci Food Agric* 88:43–47 (2008).

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

71. PINTO, V. B.; COSTENARO-FERREIRA, C.; OLIVEIRA, P. L. S.; OLIVEIRA, R. R. B.; PIEDRAS, S. R. N.; POUHEY, J. L. O. F. Performance of jundiá larvae, *Rhamdia quelen*, fed on probiotic supplemented diets. *Acta Scientiarum, Maringá*, v. 37, n. 3, p. 215-220, Jul-Sep. 2015

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

73. RISHI, P.; BHARRHAN, S.; SINGH, G.; KAUR, P. I. Effect of *Lactobacillus plantarum* and L-arginine against endotoxin-induced liver injury in a rat model *Life Sciences*, v. 89, p. 847–853, 2011.

74. ROBLES-HUAYNATE, R. A.; THOMAZ M. C.; SANTANA, A. E.; MASSON, G. C. I. H.; AMORIM, A. B. A.; SILVA, S. Z.; RUIZ, U. S.; WATANABE, P. H.; BUDIÑO, F. E. L. Probiótico em dietas de suínos sobre os parâmetros sanguíneos e digestibilidade de rações. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 35, n. 3, p. 1627-1636, maio/jun. 2014.

75. RODRIGUES, F. S de S; POLIDORI, M. M. Enfrentamento e resiliência de pacientes em tratamento quimioterápico e seus familiares. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.54, n.4, p. 619-627, 2012.

76. SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

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

78. SALIFU, M. O.; BATUMAN, V. Azotemia. Medscape, 2018. <https://emedicine.medscape.com/article/238545-print>
79. SANTOS, V. M. R dos.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova*, v.30, n.1, p. 159-170, 2007.
80. SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A.; SILVA, G. B.; BELTRAN, J. S. O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A. R.; NEVES, S. M. P.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 138-145, 2016.
81. SAYED-AHMED MM. Progression of cyclophosphamide-induced acute renal metabolic damage in carnitine-depleted rat model. *Clin Exp Nephrol* 2010; 14:418–26.
82. SCHNEIDER CDE, OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte* 2004; 10:87-90.
83. SENESSE P, ASSENAT E, SCHNEIDER S, CHARGARI C, MAGNE N, AZRIA D, HEBUTERNE X. Nutritional support during oncologic treatment of patients with gastrointestinal cancer: who could benefit? *Cancer Treat Rev.* 2008; 34:568–75.
84. SIEDLER, B. S.; ROLOFF, B. C.; DE SÁ, G. L.; NEIS, A.; CONCEIÇÃO, F. R.; HARTWIG, D. D.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; CAMPOS, F. S.; ROEHE, P. M.; HARTLEBEN, C. P.; MCBRIDE, A. J. A. Secretory expression of bovine herpesvirus type 1/5 glycoprotein E in *Pichia pastoris* for the differential diagnosis of vaccinated or infected cattle. *Protein Expression and Purification*, v.130, p.21-27, 2017.
85. SHARMA, S.; CHATURVEDI, J.; BHUSHAN, P.; SINGH, R. L.; KAKKAR, P. Probiotic *Enterococcus lactis* IITRHR1 protects against acetaminophen-induced Hepatotoxicity. *Nutrition*, v. 28, p. 173–181, 2012.
86. SHASHIDHARA, R. G.; DEVEGOWDA, G. Effect of Dietary Mannan Oligosaccharide on Broiler Breeder Production Traits and Immunity. *2003 Poultry Science* 82:1319–1325. <http://ps.oxfordjournals.org/>

87. SPRING, P.; WENK, C.; DAWSON, K. A.; NEWMAN, K. E. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of Salmonella-challenged broiler chicks. 2000 Poultry Science 79:205–211. <http://ps.oxfordjournals.org/>
88. STORCH O. B. Avaliação como probióticos para frangos de corte de *Pichia pastoris* e *Pichia pastoris* recombinante contendo o gene da fosfolipase C de *Clostridium perfringens*. Dissertação de mestrado, Pelotas: 2008.
89. TELES, K. A.; MEDEIROS-SOUZA, P.; LIMA, F. A. C.; ARAÚJO, B. G.; LIMA, R. A. C. Rotina de administração de ciclofosfamida em doenças autoimunes reumáticas: uma revisão. *rev bras reumatol.* 2017; 57(6):596–604.
90. TRAN, A.M. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: A case study on the recombinant production of human granulocytemacrophage colony-stimulating factor, *BMC Res Notes* 10(1): p148, 2017.
91. TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. *Mutation Research*, v. 696, p. 69–80, 2010.
92. UPTODATE. Cyclophosphamide: Drug information. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/cyclophosphamide-drug-information?source=preview&search=ciclofosfamida&anchor=F13494888#F13494888> Acesso em 19 de março de 2017.
93. VAN-CUTSEM E.; ARENDS J. The causes and consequences of câncer associated mal nutrition. *Eur J Oncol Nurs.* 2005; 9 Suppl 2: S51–63.
94. VIEIRA, M.M.; MACEDO, F.Y.; FILHO, J.N.; COSTA, A.C.; CUNHA, A.N.; SILVEIRA, E.R.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *Phytother. Res.* v.18, p. 135-141. 2004.
95. WAITZBERG, D. L. Dieta, nutrição e câncer. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2006. 783 p.
96. WEI, H.; JIANG L.; XUE Y.; FANG D.; GUO H. Secreted expression of Dengue virus type 2 full-length envelope glycoprotein in *P. pastoris*. *Journal of Virological Methods.* v. 109, p.17-23, 2003.

97. YADAV, R.; KHAN, S. H.; MADA, S. B.; MEENA, S.; KAPILA, R.; KAPILA, S. Consumption of Probiotic *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898-Fermented Milk Attenuates Dyslipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation in Male Rats Fed on Cholesterol-Enriched Diet. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9429-4>
98. YALÇIN, S.; YALÇIN, S.; ÇAKIN, K.; ELTAN, O.; DAGASAN, L. Effects of dietary yeast autolysate (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance, egg traits, egg cholesterol content, egg yolk fatty acid composition and humoral immune response of laying hens. *JSciFoodAgric2010*; 90: 1695–1701.
99. ZHOU, J.S.; SHU, Q.; RUTHERFURD, K.J.; PRASAD, J.; BIRTLES, M.J.; GOPAL, P.K.; GILL, H.S. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. *International Journal of Food Microbiology* 56 (2000) 87–96.
100. ZULUAGA, A. F.; SALAZAR, B. E.; RODRIGUEZ, C. A.; ZAPATA, A. X.; AGUDELO, M.; VESGA, O. Neutropenia induced in outbred mice by a simplified low-dose cyclophosphamide regimen: characterization and applicability to diverse experimental models of infectious diseases. *BMC Infectious Diseases*sv. 55, p. 1-10, 2006.