

Tese

Bárbara Abranches de Araújo Pôrto

***Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG A-905
enriquecida com selênio diminui inflamação no jejuno
causada por mucosite induzida por 5-fluorouracil**

Belo Horizonte

2016

Tese

5

Bárbara Abranches de Araújo Pôrto

10

Saccharomyces cerevisiae linhagem UFMG A-905
**enriquecida com selênio diminui inflamação no jejuno
causada por mucosite induzida por 5-fluorouracil**

15

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas (Microbiologia).

20

Orientador:

25

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins
(Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG)

Orientadora no exterior:

Profa. Dra. Enrica Pessione (UNITO, Itália)

30

Belo Horizonte

2016

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos são para:

- 5 A Deus pela minha família e a meus pais e irmãos e avó pelo apoio e amor.

O meu orientador, Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins, pelos ensinamentos, paciência, amizade, por toda a confiança depositada em mim e pela oportunidade de ir além do que eu imaginava.

10

Os amigos do LABio, em especial: Bruna, Rafa, Anna, Spencer, Éricka, Quésia, Angélica, Cinthia, Carol, Victor, Fabs, Ari e Luciana pelo companheirismo, amizade e pelos muitos experimentos que passamos juntos, pelas discussões científicas e pelos momentos de descontração que fizeram da nossa sala de
15 estudantes um lugar mais divertido.

A Profa. Dra. Enrica Pessione por ter me recebido com tanto apreço em seu laboratório e por ter me dado a oportunidade não só de adquirir novos conhecimentos científicos, mas também de vida. Aos amigos do Laboratorio di
20 Biochimica e Proteomica dei Microrganismi, em especial à Erika que se dedicou muito ao trabalho que fizemos juntas e me ensinou muito. Aos amigos Alessandro, Lori, Giuli, Chiara, Simona por todo apoio no laboratório ensinamentos e a Sere e Vale por me ajudarem sempre. Mais do que isso, obrigada por terem feito dos meus dias na Itália bastante felizes.

25

Os amigos Mário, Leo, Carol, Bianca, Tássia, Mayra, Yasmin, Camila, Luciana, Adriano pela amizade, por sempre me apoiarem e ajudarem quando eu precisei, e também pelos belos cafés que compartilhamos que com certeza foram essenciais nessa jornada.

30

Os professores Dr. Jacques R. Nicoli, Dra. Sílvia Beleza de Moura e Dra. Elisabeth Neumann pela convivência e aprendizado humano e profissional, e a todos do LEFM que de alguma forma me ajudaram a realizar esse trabalho.

A Mazé, não só pela colaboração com esse trabalho, mas, também, pelos conselhos científicos, amizade e incentivo sempre.

5 A Profa. Dra. Simone Generoso pela colaboração e pelas discussões sempre construtivas para o aperfeiçoamento desse trabalho.

Os colaboradores deste trabalho: Profa. Dra. Camila Megale de Almeida Leite, Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite e sua aluna Paola, Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso.

10

A Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, por ter permitido o acesso a seu laboratório para as análises histológicas e também Dra. Cristiane e as alunas Mayra e Talita pela disponibilidade em ajudar sempre.

15 Os alunos do laboratório de Micologia. Ju não só pela colaboração nesse trabalho, mas também pela amizade, Rafa e Marli, pela amizade e por sempre me ajudarem quando precisei. Agradeço também a: Rodrigo, Ellen, Lorena, Alide, Noelly Maira pela ótima convivência durante todos esses anos.

20 A minha querida amiga Silvinha por sempre estar ao meu lado, e os amigos Samir, Jaque, Thaysa, Gabi, Augusto e Nati, pela amizade e momentos de descontração. A todos do MOA que sempre me receberam tão bem em seu laboratório.

25 Os professores da Pós-graduação da Microbiologia e funcionários.

Os membros da banca por terem aceitado o convite.

A Capes, o CNPq e a Fapemig pelo apoio financeiro.

30

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

5 - *Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins*

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

- *Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli*

10

Laboratorio di Biochimica e Proteomica dei Microrganismi, Facoltà di Scienze MFN, D.B.A.U - Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università di Torino, Torino, Itália

- *Profa. Dra. Enrica Pessione*

15 - *Dra. Erika Mangiapane*

Laboratório de Radiobiologia, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN)

- *Dra. Maria José Neves*

20

Laboratório de Radioquímica, CDTN/CNEN

- *Profa. Dra. Maria Ângela de Barros Correia Menezes*

Departamento de Enfermagem Básica, Escola de Enfermagem, UFMG

25 - *Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso*

Laboratório de Radioisótopos, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFMG

- *Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso*

30

Laboratório Profa. Conceição Machado, Departamento de Morfologia, ICB, UFMG

- *Profa. Dra. Camila Megale de Almeida Leite*

Laboratório de Neuro-Imuno-Patologia Experimental, Departamento de Patologia Geral, ICB, UFMG

- *Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes*

5 Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG

- *Prof. Dr. Daniel de Assis Santos*

Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG

10 - *Profa. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite*

SUMÁRIO

	Sumário.....	vii
	1. Introdução.....	24
	1.1. Mucosite.....	24
5	1.2. Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e estresse oxidativo.....	26
	1.3. Selênio.....	29
	1.4. Leveduras e selênio.....	31
	1.5. Probióticos.....	32
	1.6. A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> linhagem UFMG A-905.....	33
10	2. JUSTIFICATIVA.....	36
	3.OBJETIVOS.....	38
	3.1.Objetivo geral.....	38
	3.2.Objetivos específicos.....	38
15	3.2.1. Objetivo específico 1: avaliar o efeito do enriquecimento da levedura com Se, analisando:.....	38
	3.2.2. Objetivo específico 2: avaliar o efeito da levedura enriquecida (ou não) com Se em modelo de mucosite induzida por 5-FU, analisando:.....	38
	4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
20	4.1. Efeito do enriquecimento com Se nas células da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905.....	40
	4.1.1. Micro-organismo.....	40
	4.1.2. Desenho experimental.....	40
	4.1.3. Capacidade de incorporação de selênio em diferentes concentrações..	40
25	4.1.4. Avaliação da capacidade de incorporação e dessorção de selênio pela levedura.....	40
	4.1.5. Análise por ativação neutrônica.....	41
	4.1.6. Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	41
	4.1.7. Análise da viabilidade celular.....	42
30	4.1.8. Influência do selênio na formação de radicais livres nas células de levedura.....	42
	4.1.8.1. Preparo dos extratos celulares.....	42
	4.1.8.2. Peroxidação de lipídios nas células.....	42
	4.1.8.3. Resíduos sulfidrílicos totais das células.....	43
35	4.1.9. Efeito do selênio em proteínas, por análise proteômica, de células de leveduras submetidas a diferentes concentrações de selênio.....	43

	4.1.9.1. Curva de crescimento	43
	4.1.9.2. Preparo dos extratos celulares para análise proteômica	44
	4.1.9.3. Obtenção de extratos celulares.....	44
	4.1.9.4. Precipitação com metanol e clorofórmio	44
5	4.1.9.6. Segunda dimensão - SDS-PAGE.....	45
	4.1.9.7. Análise de imagem.....	46
	4.1.9.8. Espectrometria de massa.....	47
	4.2. Avaliação do efeito da levedura enriquecida com selênio em modelo de mucosite induzida por 5-FU	47
10	4.2.1. Animais utilizados	47
	4.2.3. Indução de mucosite	48
	4.2.4. Tratamento com a levedura enriquecida com selênio	48
	4.2.5. Desenho experimental	48
	4.2.6. Determinação da permeabilidade intestinal	49
15	4.2.7. Análises histopatológicas	49
	4.2.10. Ensaio de MPO	50
	4.2.11. Atividade da enzima EPO	50
	4.2.12. Dosagem da quimiocina CXCL1/KC e da citocina IL-1 β	51
	4.2.13. Avaliação dos parâmetros oxidativos	52
20	4.2.13.1. Avaliação da peroxidação lipídica	52
	4.2.13.2. Determinação da concentração de nitritos	52
	4.3. Análise estatística	52
	5. Resultados e Discussão.....	54
25	5.1. Efeito do enriquecimento com selênio nas células da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG-A 905	54
	5.1.1. Verificação da capacidade de incorporar selênio.....	54
	5.1.3. Dectecção de selênio na parede celular por microscopia eletrônica de transmissão.....	56
	5.1.4. Análise da viabilidade celular	57
30	5.1.5. Influência do selênio na formação de radicais livres nas células da levedura	58
	5.1.5.1. Determinação da peroxidação lipídica	58
	5.1.5.2. Determinação dos resíduos sulfidrílicos totais	59
	5.1.6. Efeito do selênio em proteínas por análise proteômica.....	61

	5.1.6.1. Curva de crescimento	61
	5.1.6.2. Efeito do selênio na expressão de proteínas da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905	61
5	5.2. Avaliação do efeito da levedura enriquecida com selênio em modelo mucosite induzida por 5-FU	66
	5.2.1. Aspectos clínicos da evolução da mucosite	66
	5.2.2. Permeabilidade intestinal e níveis de sIgA no fluido intestinal	67
	5.2.3. Aspectos histopatológicos	69
10	5.2.4. Avaliação do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para o sítio primário de inflamação	71
	5.2.5. Avaliação dos parâmetros oxidativos e quimiocina CXCL1/KC e da interleucina IL-1 β	73
	6. Conclusões	77
	8. Referências Bibliográficas	78
15	ANEXO I	85
	ANEXO II	86

LISTA DE TABELAS

	Tabela 1:	Programa da focalização isoeétrica <i>strips</i>	3-10.....	40
5	Tabela 2:	Composição dos géis SDS-PAGE.....		41
	Tabela 3:	Identificação das proteínas por espectrometria de massa.....		60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O diagrama mostra as alterações clínicas que ocorrem durante o desenvolvimento de mucosite. Cinco fases são mostradas: 1) Iniciação; 2) Regulação positiva e geração de mensagem; 3) Sinalização e amplificação; 4) Ulceração; 5) Cura.....25
- Figura 2:** Determinação da quantidade de selênio incorporado pela levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 h de crescimento em meio YPG contendo selênio, sendo (a) significativo em relação ao controle, (b) significativo em relação a 4 e 8 mg/L, (c) significativo em relação a 40 mg/L.....54
- Figura 3:** Determinação da quantidade de selênio incorporado após 24 h com Se e a ocorrência de dessorção de Se pela levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 e 48 h de crescimento em meio YNB sem selênio, sendo (a) significativo em relação a 24 h de incubação sem selênio.....55
- Figura 4:** Análise por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Células na situação controle. (B) Células após 8 h de crescimento na presença de 100 mg/L de selênio no meio. (C) Células na situação controle. (B) Células após 24 h de crescimento na presença de 100 mg/L de selênio no meio. A seta 1 demonstra os sais de Se presente no meio externo e a seta 2 indica os depósitos de Se na parede celular da levedura.....56
- Figura 5:** Contagem em placa de células de *S. cerevisiae* UFMG A-905 incubadas em diferentes concentrações de selenito de sódio, sendo (a) significativo em relação ao controle e (b) significativo em relação a 50 mg/L.....58
- Figura 6:** Determinação da peroxidação de lipídios na levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 h de crescimento em meio YPG contendo selênio, sendo (a) significativo em relação ao controle.....59
- Figura 7:** Determinação dos resíduos sulfidrílicos livres na levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 h de crescimento em meio YPG contendo selênio, sendo (a) significativo em relação ao controle e (b) significativo em relação a 20 mg/L.....60

	Figura 8: Curva de crescimento de células da levedura <i>S. cerevisiae</i> UFMG A-905 na situação controle e com 100 mg/L de selenito de sódio, durante 24 h.....	61
5	Figura 9: Mapas de expressões proteicas com p/ (3-10). (A) controle. (B) Células tratadas com 100 mg/L de selenito de sódio. Proteínas marcadas em verde foram reguladas de forma positiva e, em vermelho, de forma negativa.....	62
10	Figura 10: Proteínas identificadas e divididas por função. Para cada proteína identificada as médias dos volumes e suas variações foram normalizadas (SEM) nas duas condições experimentais mostradas. As proteínas identificadas foram divididas em 4 funcionalidades.....	63
15	Figura 11: Perda de peso dos camundongos em relação ao peso no início do tratamento com 5-FU (dia 0 - primeiro dia de indução da mucosite).....	66
	Figura 12: Variação do consumo de ração pelos camundongos. (dia 0 - primeiro dia de indução da mucosite).....	67
20	Figura 13: Avaliação da permeabilidade intestinal nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (b) significativo em relação ao 5-FU.....	68
25	Figura 14: Avaliação da produção de sIgA. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls (p< 0,05).....	68
30	Figura 15: Análise histológica do jejuno: Os grupos controles estão representados pelas letras A, C e E (CTL, 905, 905+Se, respectivamente) e os animais com mucosite induzida e os tratamentos com a levedura estão representados pelas letras B, D e F (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU, respectivamente). Vilosidades encurtadas (setas), infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e camada muscular (cabeças de seta) e necrose de cripta (asterisco) estão presentes nos grupos mucosite (B). Preservação parcial das vilosidades (setas) e criptas (asteriscos) e infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (pontas de	

setas) são observadas nos grupos 905+5-FU, 905+Se+5FU.....69

Figura 16: Score histológico geral dos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (b) significativo em relação ao 5-FU ($p < 0,05$).....70

Figura 17: Altura das vilosidades do jejuno. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls. Sendo (a) significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).....71

Figura 18: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, no jejuno, por meio da atividade de sua enzima MPO, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) após 72 horas, sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (b) significativo em relação ao 5-FU. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).....72

Figura 19: Avaliação qualitativa da presença de eosinófilos, no jejuno, por meio da atividade de sua enzima EPO, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) após 72 horas, sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (b) significativo em relação ao 5-FU ($p < 0,05$). . Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).....72

Figura 20: Concentração de nitritos após a exposição a 5-FU, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (b) significativo em relação ao 5-FU, (c) significativo em relação ao 905+5-FU. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).....73

Figura 21: Quantificação de IL-1 β no jejuno. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls.....74

Figura 22: Concentração da quimiocina CXCL1/KC no jejuno, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) após 72 horas, sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (b) significativo em relação ao 5-FU. Teste:

5 ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).....74

Figura 23: Produção de TBARS no jejuno, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (b) significativo em relação ao 5-FU, (c) significativo em relação ao 905+5-FU. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).....76

10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- %: porcentagem
- γ : gama
- 5 β : beta
- μm : micrometro
- μM : micromolar
- μmoles : micromoles
- μg : micrograma
- 10 μL : microlitro
- $^1\text{O}_2$: oxigênio *singlet*
- 5-FU: 5-fluoruracil
- 905: *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905
- 905+Se: *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 enriquecida com selênio
- 15 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA: ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio
- ANOVA: análise de variância
- AP-1: proteína ativadora-1
- APC: células apresentadoras de antígenos
- APS: persulfato de amônio
- 20 ASC: área de superfície corporal
- ATP: adenosina trifosfato
- BHT: hidroxitolueno butilado
- BSA: soroalbumina bovina
- CAT: catalase
- 25 CD: doença de Crohn
- CDTN: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
- CEBIO: Centro de Bioterismo
- cm: centímetros
- CNEN: Comissão Nacional de Energia Nuclear
- 30 COX-2: ciclo-oxigenase 2
- CPM: contagem por minuto
- CTIT: Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica
- CTL: controle

CXCL-1/KC: *chemokine (C-X-C motif) ligand 1/keratinocyte chemoattractant*

Da: Dalton

DAB: diaminobenzidina

DAI: Índice Diário de Atividade da Doença

5 DHAP: fosfato de diidroxiacetona

DII: doença inflamatória intestinal

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxinucleotídeos trifosfato

10 DO: densidade ótica

DSS: *dextran sodium sulfate*

DTNB: 5-5´dithio-bis 2-ácido-nitrobenzoico

DTT: *dithiothreitol*

EDTA: *Ethylenediamine-tetra acetic acid*

15 eIF5A: fator de início de tradução de eucariotos 5^a

EPO: peroxidase eosinofílica

EUA: Estados Unidos da América

FAD: flavina adenina desidrogenase

FAO: Organização de Alimentos e Agricultura

20 g: força centrífuga relativa (RCF, *Relative Centrifuge Force*)

g: grama

G3P: gliceraldeído-3-fosfato

GR: glutationa redutase

GSH: glutationa reduzida

25 GSH-Px: glutationa peroxidase

GS-SeH: glutationoselenol

GS-Se-SG: selenodiglutationa

GSSG: glutationa oxidada

GTS: glutationa S-transferase

30 h: hora

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HCl: ácido clorídrico

- HE: Hematoxilina e Eosina
HSe-: selenito de hidrogênio
HTAB: hexadeciltrimetilamônio
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
- 5 IEF: focalização isoelétrica (*Isoelectric Focusing*)
IFN- γ : interferon gama
IL-12: interleucina 12
IL1- β : Interleucina 1 beta
IL-4: interleucina 4
- 10 IL-6: Interleucina 6
iNOS: óxido nítrico sintetase induzida
kDa: quilodáton
Kg: quilograma
L: litro
- 15 LAB: bactérias do ácido láctico
M: molar
mA: mili-ampere
MALDI: *Matrix-assisted laser desorption/ionization*
MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos
- 20 MBq: megabequerel
MDA: malondialdeído
ME: microscopia eletrônica
mg: miligrama
min: minuto
- 25 mL: mililitro
mm: milímetros
mM: milimolar
MMP: metaloproteinases de matriz
MPO: mieloperoxidase
- 30 MS: *mass spectrometry*
MTT: brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium
n: nêutron
N: normal
Na₂SeO₃: selenito de sódio

- NaCl: cloreto de sódio
- NaOH: hidróxido de sódio
- NB2: nível de biossegurança 2
- NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
- 5 NF- κ B: fator nuclear kappa B
- nm: nanômetros
- NO: óxido nítrico
- NR: *Nutrient Requirement*
- O₂: oxigênio molecular
- 10 O₂^{•-}: ânion superóxido
- °C : graus Celsius
- OH•: radical hidroxil
- OPD: o-fenilenodiamina
- p/v: peso por volume
- 15 PAS/AB: *Alcian Blue* e Ácido Periódico Combinado de Schiff
- PBS: tampão fosfato salino
- PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
- pH: potencial hidrogeniônico
- PMSF: *phenylmethysulphonyl fluoride*
- 20 ppm: parte por milhão
- PRI: *Population Reference Intake*
- RDA: *Recommended Dietary Allowance*
- RNI: *Reference Nutrient Intake*
- RNS: espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species*)
- 25 ROS: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
- rpm: rotações por minuto
- R-SeH: selenol
- R-SH: tióis
- S: enxofre
- 30 s: segundo
- SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- Se: selênio
- Se-C: selenocisteína
- Se-Met: selenometionina

- slgA: imunoglobulina A secretória
SOD: superóxido dismutase
ST: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium
TBARS: *Thiobarbituric Acid Reactive Species*
- 5 TCA: ácido tricloroacético
TE: tampão Tris/EDTA
TEM: microscópio eletrônico de transmissão
TGI: trato gastrointestinal
Th1: célula T helper 1
- 10 Th2: célula T helper 2
TMB: tetrametilbenzidina
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TPI1: triose fosfato isomerase
TPP: trifenilfostina
- 15 U: unidade
UC: colite ulcerativa
UFC: unidades formadoras de colônia
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UV: ultra-violeta
- 20 v/v: volume por volume
V: volt
W: watt
WHO: Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)
YNB: *Yeast Nitrogen Base*
- 25 YPG: Yeast extract, peptone, glucose
 α : alfa
 κ : kappa

RESUMO

Mucosite gastrointestinal é um dos principais problemas associados à terapia contra o câncer (quimioterapia e radioterapia). Entretanto, não há terapia efetiva
5 contra esse efeito colateral. O agente anti-metabólito 5-fluorouracil (5-FU) é usado no tratamento do câncer, porém esse fármaco causa danos gastrointestinais, especialmente nas mucosas, levando a alterações na permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e na imunidade. A inflamação é a primeira reposta de defesa contra agentes infecciosos e isquemia de tecidos. A formação de espécies
10 reativas de oxigênio (ROS) desempenha um papel muito importante no seu desenvolvimento. Para minimizar os efeitos nocivos das ROS existem as defesas antioxidantes, onde o selênio (Se) apresenta uma função importante, pois é componente das selenoproteínas, que têm funções antioxidantes e são necessárias para a detoxificação celular. Atualmente há um interesse crescente
15 no uso de leveduras enriquecidas com Se porque elas são capazes de converter Se inorgânico em selenometionina, forma metabolizada pelos mamíferos. O uso de leveduras para consumo humano e animal já vem sendo feito por meio dos probióticos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG A-905 foi selecionada e estudada por nosso grupo quanto ao seu potencial probiótico. Em
20 modelos animais com mucosite induzida por irinotecano (fármaco quimioterápico), ela foi capaz de diminuir o estresse oxidativo, preservar células caliciformes e recuperar a mucosa intestinal quando usada como probiótico. Portanto, o tratamento com a levedura enriquecida com Se pode ser uma boa alternativa para minimizar os efeitos colaterais do fármaco 5-FU em pacientes em tratamento
25 oncológico. Desse modo, nossos dois principais objetivos foram: (i) avaliar a incorporação de Se pela levedura utilizando uma abordagem proteômica, e (ii) verificar o seu potencial para uso como um probiótico suplementado com Se em modelo animal com mucosite induzida por 5-FU. Nossos resultados demonstraram que a levedura tem boa capacidade de incorporar Se, no entanto
30 esse metal em altas concentrações causa diminuição da viabilidade, estresse oxidativo e mudanças na expressão de proteínas. Quando esta levedura foi utilizada no tratamento da mucosite, nossos resultados demonstraram que o tratamento com a levedura e a levedura enriquecida com Se foram capazes de diminuir a permeabilidade intestinal e melhorar os aspectos histológicos. O

tratamento com a levedura enriquecida com Se atenuou os parâmetros inflamatório, diminuindo a peroxidação lipídica, concentração de nitritos, resultando em um menor recrutamento de eosinófilos, neutrófilos e quimiocina CXCL1/KC no jejuno, demonstrando, assim, o potencial probiótico e antioxidante
5 dessa levedura quando associada ao Se orgânico.

Palavras-chave: probiótico, *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG A-905, selênio, mucosite, 5-fluorouracil, proteoma, inflamação.

ABSTRACT

Gastrointestinal mucositis is the major problem associated with cancer therapy (chemotherapy and radiotherapy). However, there is no effective therapy against this side effect. The anti-metabolite 5-fluorouracil (5-FU) agent is used in cancer treatment, but this drug causes gastrointestinal damage, especially on mucous membranes, leading to changes in intestinal permeability, bacterial translocation and immunity. Inflammation is the first response against infectious agents and tissue ischemia. Among the inflammatory processes of mucositis, formation of reactive oxygen species (ROS) plays a very important role in its development. To minimize the deleterious effects of ROS there are some antioxidant defenses, which selenium (Se) presents an important function because it is a component of selenoproteins, having antioxidant functions, and this metal is necessary for cellular detoxification. Currently there is a growing interest in the use of yeasts enriched with Se because they are able to convert inorganic Se into selenomethionine, which can be better metabolized by mammals. The use of yeasts for human and animal consumption is already being done through probiotics. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG-905 was selected and studied by our group for its probiotic potential. In animal models with mucositis induced by irinotecan (chemotherapeutic drug), this yeast was able to decrease oxidative stress, preserving goblet cells and recovering the intestinal mucous membrane when used as a probiotic. Therefore, treatment with the yeast enriched with Se can be a good alternative in minimizing the side effects of the drug 5-FU in patients undergoing cancer treatment. Thus, our two main objectives were: (i) evaluate the incorporation of Se by yeast using a proteomic approach, and (ii) verify its potential for use as a probiotic supplemented with Se in an animal model of mucositis induced by 5-FU . When this yeast was used to treat mucositis, our results demonstrated that treatment with yeast and yeast enriched with Se, were able to reduce intestinal permeability and improved histology. Treatment with yeast enriched with Se attenuated the inflammatory parameters therefore decreased lipid peroxidation, concentration of nitrites, resulting in a decrease recruitment of eosinophils, neutrophils and chemokine CXCL1 / KC in the jejunum, thus demonstrating the probiotic and antioxidant potential of such yeast when associated with organic Se.

Keywords: probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905, selenium, mucositis, 5-fluorouracil, proteome, inflammation.

1. Introdução

1.1. Mucosite

A mucosite é o maior problema oncológico associado à citotoxicidade da quimioterapia e radioterapia. O agente anti-metabólito 5-fluorouracil (5-FU) é usado no tratamento de inúmeros tipos de câncer, incluindo o colorretal e o de mama, e está associado a danos intestinais, especialmente nas mucosas intestinais, apoptose das células do intestino, alterações na permeabilidade intestinal, translocação bacteriana e na imunidade intestinal (Ferreira *et al.*, 2012; Justino *et al.*, 2014). Este fármaco bloqueia a síntese do DNA e RNA, desencadeando a apoptose das células cancerosas e das células de tecidos saudáveis com alta taxa de divisão celular (Longley *et al.*, 2003).

Os sinais e sintomas da mucosite são: dores na boca e garganta, ulcerações, dor e distensão abdominal, vômitos e diarreia. Sua prevalência varia de 40%, em pacientes submetidos a doses padrões de quimioterapia, a 100% em pacientes submetidos a altas doses de quimioterápicos. Esse índice representa um significativo problema clínico e econômico em oncologia, pois a presença da mucosite durante um ciclo de terapia do câncer aumenta significativamente o risco de redução da dose, a frequência de infecções e hemorragias, bem como a duração e custo da hospitalização. Além disso, a ocorrência da mucosite está associada a quadros de infecções, tendo-se a necessidade de fazer uso de antibióticos (Bowen *et al.*, 2011).

Sonis (2004) propôs um modelo para explicar a patobiologia da mucosite, que inclui cinco fases: (i) iniciação, (ii) regulação positiva e geração de mensagem, (iii) sinalização e amplificação, (iv) ulceração e (v) cura (Figura 1). A primeira fase (iniciação) ocorre imediatamente após a exposição a agentes citotóxicos, e resulta em danos teciduais diretos aos componentes da mucosa, como resultado da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ela é seguida pela fase de regulação positiva e geração de mensagens, na qual se observa ativação de fatores de transcrição importantes, em particular o fator nuclear kappa B (NF- κ B). Este fator de transcrição é responsável pela regulação positiva de até 200 genes que têm efeitos sobre a integridade da mucosa por meio da indução de morte celular clonogênica (perda da capacidade celular de se multiplicar), apoptose e lesão dos tecidos que compõem a mucosa, não se

limitando ao epitélio (Sonis, 2004). A ativação do NF- κ B resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 β e IL-6, e ele está envolvido em pelo menos 12 vias relevantes para o desenvolvimento de mucosite (Sonis, 2004; Bowen *et al.*, 2007).

5

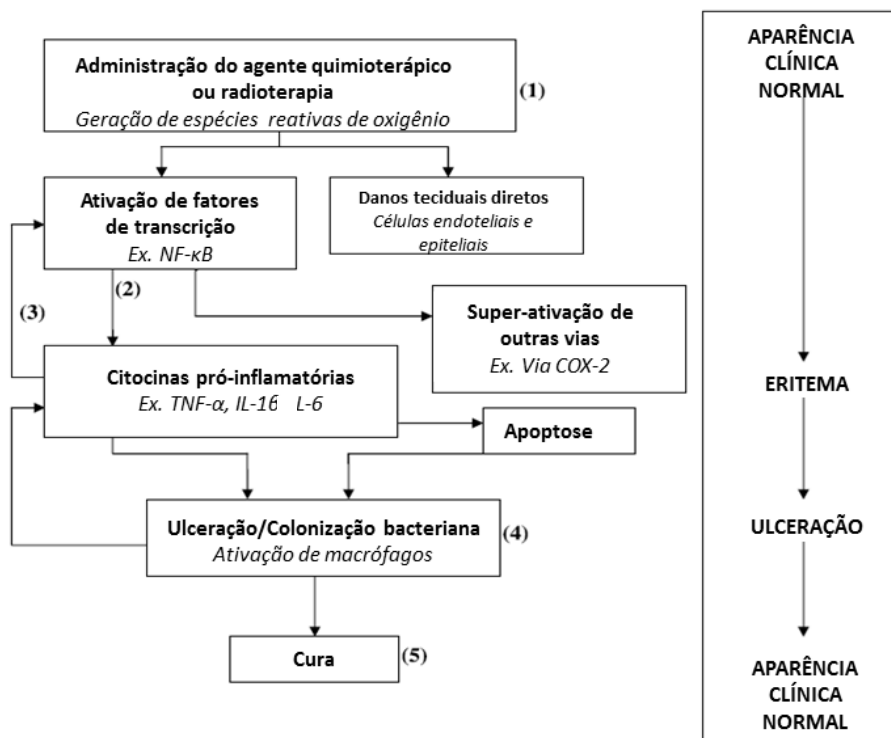


Figura 1. O diagrama mostra as alterações clínicas que ocorrem durante o desenvolvimento de mucosite: Cinco fases são mostradas: 1) Iniciação, 2) Regulação positiva e geração de mensagem, 3) Sinalização e amplificação, 4) Ulceração, e 5) Cura. Fonte: Logan *et al.* (2008). (Adaptado).

10

A terceira fase (sinalização e amplificação) envolve sinais de amplificação e ocorre como consequência da produção de citocinas pró-inflamatórias, que atuam via mecanismos de *feedback* positivo, causando a ativação adicional de NF- κ B e subsequente aumento da produção de citocinas. Outras proteínas biologicamente ativas ou mediadores pró-inflamatórios, como a ciclo-oxigenase 2 (COX-2), também são super-expressos, o que resulta em reações inflamatórias que, por sua vez, levam à ativação de metaloproteinases de matriz (MMP), cuja produção culmina em danos teciduais adicionais. A fase ulcerativa se desenvolve onde clinicamente há uma violação do epitélio. É nessa fase que a mucosite se torna clinicamente evidente. O paciente sente dor e sintomas abdominais e o risco de

15

20

infecção sistêmica aumenta. Além disso, produtos bacterianos podem estimular ainda mais a amplificação da produção de citocinas, levando à potencialização da lesão e, conseqüentemente, mais inflamação. A última fase consiste na cura, ocorre dentro de aproximadamente duas semanas após a interrupção do tratamento, e é a menos bem compreendida e estudada. Esta fase resulta na restauração da aparência normal da mucosa ocasionada pelo processo de renovação tecidual, onde parece ser a COX-2 que desempenha um papel importante na "reconstrução" do epitélio (Sonis, 2004; Logan *et al.*, 2008; Sultani *et al.*, 2012).

As ciclo-oxigenases (COX) são enzimas-chave que catalisam a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. A COX-2 é uma forma induzível da enzima, localizada principalmente nas células e tecidos envolvidos em processos inflamatórios. Na reação com o ácido araquidônico é gerado o radical hidroxila, que é um radical altamente reativo com o oxigênio fazendo parte das ROS. Estas, por sua vez, desempenham um papel significativo na patogênese de várias doenças e têm um papel fundamental na resposta inflamatória (Chu *et al.*, 2004; Li & Zhou, 2011).

1.2. Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e estresse oxidativo

A evolução dos organismos que usam a molécula de oxigênio (O_2) como um aceptor final de elétrons para a respiração (organismos aeróbicos) deu origem a um paradoxo. De um lado, a respiração aeróbica propicia maior ganho energético em relação à anaeróbica, o que confere a esses organismos maior vantagem competitiva. Por outro lado, a redução do O_2 a H_2O , leva a uma gradual formação de ROS intermediárias, tais como radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^{\bullet}). Na presença de luz, mediadores fotossensíveis produzem reações que podem formar o oxigênio singlet (1O_2) (Scandalios, 1997).

O O_2 pode ser tóxico para os organismos aeróbicos se este não for completamente reduzido a H_2O . Durante a respiração, o O_2 é progressivamente reduzido a duas moléculas de água que ocorre por um processo univalente sequencial que requer quatro elétrons. No entanto, a redução incompleta dá origem à formação de espécies químicas que são potencialmente oxidantes, tais como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} (Li *et al.*, 2009).

As ROS normalmente existem na célula em balanço direto com enzimas e substâncias antioxidantes. A formação de ROS pode ser acelerada como consequência de várias condições de estresse do meio, incluindo radiação ultravioleta (UV), alta intensidade de luz, exposição a herbicidas, temperaturas extremas, toxinas, poluentes, metais, dentre outros (Halliwell, 2007). No entanto, ela também pode ocorrer por meio de processos fisiológicos, pois as ROS são um produto normal do metabolismo celular. Estudos comprovam que a maior fonte intracelular de ROS é a mitocôndria, onde defeitos na cadeia respiratória mitocondrial e na maquinaria de síntese de adenosina trifosfato (ATP) são muitas vezes acompanhados do aumento dos radicais livres, principalmente o $O_2^{\bullet-}$ e/ou deficiência de sistemas antioxidantes (Wojewoda *et al.*, 2010). Reações oxidativas são utilizadas em resposta a vários tipos de estresse, e como mecanismo de defesa por todos os organismos aeróbios. As ROS desempenham um papel significativo na regulação da expressão gênica e como segundo mensageiro para sinalizar várias falhas celulares (Scandalios, 1997). Apesar de existir vários sítios de formação de ROS em toda a célula, a mitocôndria parece ser a principal fonte intracelular de ROS. Mesmo sendo um sistema muito eficiente, a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial pode perder elétrons, e essa perda pode gerar ROS (Li *et al.*, 2009).

As ROS são produzidas tanto enzimaticamente quanto não enzimaticamente, entretanto as células possuem uma variedade de métodos para prevenir ou diminuir essas espécies tóxicas (Li *et al.*, 2009). Se os sistemas antioxidantes celulares não inativarem as ROS, estas podem reagir com macromoléculas celulares e aumentar o processo de peroxidação lipídica, causar danos ao DNA e/ou induzir modificações proteicas. Os danos causados a estes componentes celulares causam a perda de suas funções, podendo, dessa forma, levar à morte celular (Devipriya *et al.*, 2008).

A produção de espécies reativas do nitrogênio (*reactive nitrogen species*, RNS) desempenham importantes funções no metabolismo humano e em várias condições fisiológicas, podendo ser, também, capazes de causar danos ao DNA, proteínas e lipídios, além de reagir com o oxigênio. Dentre as RNS o principal é o radical livre NO^{\bullet} (óxido nítrico), pois é a partir dele que surgem as outras RNS. Em organismos vivos o óxido nítrico é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina formando NO^{\bullet} e L-citrulina, sendo tal reação catalisada pela enzima

óxido nítrico sintase (NOS) (Wong *et al.*, 1996). A NOS possui duas categorias: NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina (participa da sinalização celular) e a NOS induzível (i-NOS), produzido por células ativadas por citocinas. A reação do NO^{\bullet} com O_2 forma o radical NO_2^{\bullet} importante como iniciador da peroxidação lipídica. Outra reação que pode ocorrer é entre o radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o NO^{\bullet} formando o intermediário peroxinitrito (ONOO^-), um potente oxidante. A produção em excesso destas espécies reativas leva ao estresse oxidativo (Davis *et al.*, 2004).

O termo “estresse oxidativo” é uma expressão usada para descrever vários processos deletérios que ocorrem dentro das células, resultantes de um desequilíbrio entre a excessiva formação de espécies reativas e da defesa antioxidante limitada (Li *et al.*, 2009). O estresse oxidativo desempenha um papel importante nas doenças inflamatórias. Os macrófagos são um tipo de APC (células apresentadoras de antígenos) que infiltram nos tecidos inflamados e liberam grandes quantidades de ROS e/ou RNS, diminuindo a quantidade de antioxidantes refletindo no *status* da glutathiona intracelular (Kidd, 2003).

Para minimizar os efeitos nocivos das ROS e das RNS, os organismos aeróbicos desenvolveram defesas antioxidantes. Dentre as defesas não enzimáticas, o mais conhecido exemplo é o tripeptídeo glutathiona (L- γ -glutamil-L-cistinilglicina). A glutathiona (GSH) é a mais importante molécula de proteção e regulação antioxidante na célula, na sua forma apresenta um grupo sulfidril com ação redox que reage com oxidantes produzindo glutathiona oxidada (GSSG) que pode novamente ser reduzida, dependendo da presença da enzima glutathiona redutase (Li & Zhou, 2011).

As defesas não enzimáticas incluem compostos com ação antioxidante intrínseca, tais como as vitaminas C e E, flavonóides e β -caroteno. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GSH-Px), glutathiona redutase (GR) e glutathiona S-transferase (GTS) (Scandalios, 1997). O selênio (Se), em mamíferos, tem função antioxidante, sendo constituinte das selenoproteínas. Além disso, o Se é cofator de várias enzimas antioxidantes (GR, GTS e tiorredoxina redutase), que protegem as células contra toxinas, poluentes, contaminantes metálicos, dentre outros a que o organismo está exposto (Ponce de Leon *et al.*, 2002).

No grupo das GSH-Px isoenzimas existem enzimas compostas de selenocisteína, e a GSH-Px de mamíferos catalisa GSH-dependente pela degradação de vários hidroperóxidos. O entendimento do papel protetor do Se veio por meio da descoberta de GSH-Px no citosol. O papel fisiológico importante de GSH-Px é manter adequadamente baixos os níveis de peróxido de hidrogênio dentro da célula, portanto, diminuindo os danos potenciais dos radicais livres. Ele fornece uma segunda linha de defesa contra hidroperóxidos que podem danificar membranas e outras estruturas celulares. O Se é um elemento essencial como componente da GSH-Px, que atua em sinergia com tocoferol na regulação da peroxidação lipídica em conjunto com a catalase, que degrada o peróxido de hidrogênio a água por meio da GR e dinucleótido de flavina e adenina (FAD) no desvio das pentoses fosfato (Tapiero *et al.*, 2003).

1.3. Selênio

O Se foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius, que o nomeou como *Selene* (Deusa grega da lua, em grego). O Se é um metalóide da coluna VI na tabela periódica que pode ser encontrado em quatro estados de oxidação: Se^0 , Se^{+6} , Se^{+4} , Se^{-2} (Papp *et al.*, 2007). O Se e o enxofre (S) têm propriedades físicas e químicas comuns, e tal similaridade permite que o Se seja substituído pelo S em várias reações químicas dos sistemas biológicos. No entanto, propriedades físicas e químicas diferentes entre esses elementos lhes permitem atuações específicas nas reações químicas dos sistemas biológicos. De acordo com sua química, sugere-se que o Se se encontra na forma de selenol (R-SeH), que são compostos que correspondem aos tióis (R-SH), onde o átomo de Se é substituído pelo átomo de S (Rosen & Liu, 2009).

O Se é um elemento traço universal para todos os mamíferos, sendo muito importante para vários processos celulares. Até a metade do século XX, o Se era considerado um elemento tóxico, sem qualquer função biológica. Experimentos com dietas deficientes em Se comprovaram a importância deste na nutrição humana. Posteriormente, verificou-se que o Se é componente de aproximadamente 25 proteínas conhecidas como selenoproteínas, entre elas várias enzimas antioxidantes ou necessárias para a detoxificação celular. A grande mudança com relação aos efeitos benéficos do Se foram trabalhos mostrando sua função na prevenção do câncer (Clark *et al.*, 1996). No trabalho de

Clark e colaboradores (1996) foi visto que a suplementação de Se na dieta de pessoas vivendo em áreas deficientes no metal era capaz de reduzir em 50% a morbidade e mortalidade associadas a vários tipos de câncer.

Mamíferos assimilam Se por meio da dieta. O metaloide está presente em alimentos como grãos, cereais e carne. Para evitar a toxicidade, ele deve ser usado em doses limitadas. A ingestão de Se recomendada é de 55 µg de Se por dia para adultos saudáveis, quantidade esta suficiente para garantir as 25 selenoproteínas existentes. Níveis supra nutricionais de Se (200-300 µg/dia) estão supostamente envolvidos na prevenção de vários tipos de câncer, incluindo pulmão, colorretal e próstata (Brozmanová *et al.*, 2010). Em quantidades entre 750-800 µg/dia não foram observados efeitos adversos, porém uma ingestão em quantidades maiores, 1540-1600 µg/dia, resultou em ocorrência de selenoses, e concentrações de 3200-5000 µg/dia induziu danos ao DNA (Schrauzer, 2006). Por outro lado, 40 µg/dia foram sugeridos como ingestão mínima, e uma ingestão menor que 11 µg/dia causou problemas de deficiência de Se. É importante, também, considerar que a ingestão recomendada de Se varia de acordo com a localização geográfica, porque a quantidade de Se nos alimentos depende da quantidade de Se no solo e na água (Foster & Sumar, 1995).

O Se entra na cadeia alimentar por meio da captação e acúmulo pelas plantas. Sua concentração nos alimentos é determinada por uma série de fatores geográficos e geológicos, que são: (i) a forma química do Se e sua concentração no solo, (ii) pH do solo, que determina a natureza do Se encontrado, (iii) quantidades de matéria orgânica, hidróxidos de ferro, compostos de alumínio e argila que podem vincular-se ao Se, reduzindo sua biodisponibilidade para as plantas, (iv) a quantidade de espécies de S (por exemplo, de adubos S) que possa competir com Se na absorção, (v) da precipitação que pode retirar o Se do solo, (vi) micro-organismos do solo que convertem formas insolúveis de Se para formas solúveis (Rayman, 2004).

Em mamíferos o Se é incorporado em proteínas, tais como as “Se-contentoras” do aminoácido selenocisteína (Se-C) e selenometionina (Se-Met), denominado selenoproteínas. Mais de 15 selenoproteínas já foram descritas: 4 tipos de glutathiona peroxidase, 3 tipos de tireoide hormônio deiodinase, 3 tipos de tioredoxina redutase, selenofosfato sintetase e a selenoproteína P. A selenoproteína P é a mais comum dentre as selenoproteínas, e contém 10

resíduos Se-C por molécula, sendo uma importante supridora de Se para o fígado e tecidos periféricos. Existem também evidências de que a selenoproteína P seja um agente antioxidante e proteja as células contra o estresse oxidativo (Hrdina *et al.*, 2009). Outro papel importante das selenoproteínas já descrito é a participação em sistemas enzimáticos que atuam na proteção contra estímulos inflamatórios e substâncias carcinogênicas (Andoh *et al.*, 2005).

O Se é considerado um elemento antioxidante por ser parte do centro ativo de importantes enzimas antioxidantes, como a GSH-Px e a tioredoxina redutase. Foi demonstrado que a retenção de Se pelos tecidos varia de acordo com a forma química em que o Se for ingerido. Maiores quantidades deste elemento são absorvidos quando este se encontra na forma de Se-Met ao invés de selenito, selenato ou Se-C. Isto é devido ao fato de que a Se-Met é quimicamente semelhante à metionina, o que lhe permite ser incorporada no lugar desta (Behne *et al.*, 2009).

Frequentemente o Se é incluído nos "coquetéis" antioxidantes juntamente com as vitaminas C e E. Esta combinação pode ajudar a proteger o corpo contra uma série de doenças. A disponibilidade do Se nos suplementos alimentares tem como finalidade reforçar as defesas antioxidantes nos organismos que os ingerem, combatendo, assim, mais eficazmente os radicais livres (Kaur & Bansal, 2006).

Leveduras enriquecidas com Se são frequentemente utilizadas como suplementos alimentares porque as formas orgânicas do Se (Se-Met e Se-C) são consideradas benéficas para o organismo que as ingere, diferentemente da forma inorgânica, selenito de sódio, considerada tóxica (Rayman, 2004).

1.4. Leveduras e selênio

Atualmente há um interesse crescente no uso de leveduras enriquecidas com Se para serem utilizadas na nutrição humana e animal, como suplemento alimentar. Assim como outros organismos biológicos, leveduras têm a capacidade de incorporar diversos elementos, como ferro, cádmio, zinco e selênio (Foster & Sumar, 1995; Schomburg *et al.*, 2004). O metabolismo do Se por leveduras ainda é pouco conhecido. Devido à similaridade do Se com o S, este micro-organismo consegue absorver Se para o citosol, usando transportadores enzimáticos, tais como sulfato de permeases Sul1 Sul2 (Rosen & Liu, 2009).

As células de *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de converter Se inorgânico em Se-Met. A biosíntese de Se-Met é análoga à da metionina, utilizando as mesmas enzimas. A quantidade máxima de Se que células de leveduras são capazes de incorporar depende da quantidade de metionina contida na célula, sendo que essa quantidade de incorporação de Se não representa a quantidade total de metionina contida na célula (Schrauzer, 2006). Parte do Se se associa fisicamente com macromoléculas, especialmente as que constituem a parede celular (Rayman, 2004).

No entanto, o Se em altas concentrações é tóxico para células de leveduras. Além de compostos como a Se-Met ocorre, também, a formação de Se (0) quando a célula encontra-se em meio contendo altas concentrações desse elemento (Rosen & Liu, 2009). A formação de Se elementar está associada a mecanismos de desintoxicação que permitem a sobrevivência de micro-organismos nesse meio tóxico. Na presença de altas concentrações de Se, leveduras armazenam este elemento nos vacúolos das células de forma semelhante como fazem em presença de metais pesados. O transporte de Se para o interior da célula de levedura ocorre utilizando glutatona por meio de um transportador pertencente à família ABC (proteína c 1 p) localizado na membrana vacuolar (Kieliszek *et al.*, 2015).

Além da associação de leveduras a micronutrientes para benefício da saúde animal, outros estudos vêm demonstrando a eficácia de outros micro-organismos associados a vitaminas e outras substâncias importantes para o bom funcionamento do organismo. Kunavue & Lien (2012) demonstraram que a combinação de ácido fúlvico com um combinado de micro-organismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactics*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*) teve efeitos positivos sobre a digestibilidade de nutrientes e melhora imunológica de suínos. Ly e colaboradores (2011) observaram que a associação da vitamina D com probióticos tem efeito benéfico em quadros de asma, alergia e obesidade.

1.5. Probióticos

Probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Eles são usados em alimentos, especialmente em

produtos fermentados de uso diário e em preparações farmacêuticas (Vieira *et al.*, 2013).

Os primeiros estudos envolvendo probióticos iniciaram-se no início do século XX, com o microbiologista e zoólogo russo Ellie Metchnikoff. Ao observar a população búlgara, ele notou que esta população tinha uma média de vida superior ao restante da Europa e correlacionou esta observação com a grande ingestão de coalhada pelos búlgaros. O cientista supôs que as bactérias da coalhada eram importantes para a saúde humana e passou a defender o uso de alimentos fermentados (Guarner *et al.*, 2008).

O uso de probióticos contribui para a resistência a colonização por organismos patogênicos, ajuda na imunomodulação e pode contribuir nutricionalmente (Martins *et al.*, 2005). No entanto, cada probiótico pode ter diferentes benefícios, por isso a seleção cuidadosa de micro-organismos específicos com base em resultados clínicos desejados é uma estratégia eficaz para selecionar a terapia apropriada para uma doença (Sanders *et al.*, 2013).

Uma grande variedade de micro-organismos atende aos critérios estabelecidos pela OMS (Organização Mundial da Saúde) para ser um probiótico. Dentre os principais probióticos comercializados, podemos citar a levedura *Saccharomyces boulardii*, a bactéria Gram negativa *Escherichia coli* Nissle 1917, e várias espécies de lactobacilos e bifidobactérias (Gareau *et al.*, 2010).

Até o momento *S. boulardii* é praticamente a única levedura comercializada como probiótico na medicina humana. No entanto, Martins e colaboradores (2005) realizaram estudos com uma levedura de origem ambiental encontrada no Brasil e vêm obtendo resultados favoráveis para uso dessa levedura como probiótico.

1.6. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagem UFMG A-905

O uso de leveduras na alimentação humana e animal é comum na fabricação de alimentos e bebidas, e também como suplemento nutricional, já que ela é rica em vitaminas do complexo B, proteínas, aminoácidos e minerais traços. Por esse motivo, observa-se o aumento do interesse na busca e no uso de linhagens probióticas desse grupo de micro-organismos (Folignè *et al.*, 2010).

Martins e colaboradores (2005) selecionaram linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de diferentes ambientes do Brasil (associadas a insetos, frutas tropicais, queijo e da produção de cachaça) e realizaram testes *in vitro*, para avaliarem a

resistências dessas leveduras às condições gastrointestinais, e *in vivo*, para identificarem quais leveduras possuíam uma melhor capacidade de colonizar o trato gastrointestinal (TGI) de animais isentos de germes. Nesse estudo observou-se que *S. cerevisiae* linhagem UFMG A-905, isolada do processo de fabricação da cachaça, apresentou os melhores resultados (Martins *et al.*, 2005).

Estudos do mesmo grupo utilizando essa linhagem foram realizados a fim de avaliar a segurança de sua utilização e a capacidade de proteger camundongos desafiados com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (ST) ou com *Clostridium difficile*. A levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de diminuir a mortalidade de animais desafiados com ST e de preservação dos tecidos intestinais de animais gnotobióticos desafiados com *C. difficile*, além de não causar danos aos tecidos dos animais quando esses receberam apenas a levedura. Desse modo, com esses resultados, *S. cerevisiae* UFMG-A 905 foi considerada um potencial probiótico (Martins *et al.*, 2005).

Após demonstrar que *S. cerevisiae* UFMG A-905 não produzia substâncias antagonistas contra patógenos, Martins e colaboradores (2007 e 2011) fizeram estudos para verificar qual seria o mecanismo de proteção dessa levedura. Foi proposto que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 poderia modular o sistema imunológico entérico e com isso proteger os animais contra ST. O tratamento com a levedura inibiu a perda de peso dos animais e, também, permitiu uma maior sobrevivência dos camundongos tratados (80%), quando comparados aos animais apenas desafiados com ST (40%). O tratamento com a levedura ocasionou diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (CXCL-1/KC, IL-6, TNF- α , IFN- γ), e impediu a ativação de vias envolvidas com o processo inflamatório, como a do NF- κ B, da proteína ativadora-1 (AP-1) e das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Martins *et al.*, 2011), levando a conclusão de que essa levedura possui ação imunomodulatória.

Verificou-se também que *S. cerevisiae* UFMG A-905 possui sítios de ligação a bactérias em sua superfície. Em trabalhos com animais isentos de germe observou-se que ST liga-se, preferencialmente, à parede celular da levedura do que ao epitélio intestinal e, dessa forma, diminui a quantidade de patógenos livres capazes de se ligarem à mucosa intestinal, reduzindo o processo inflamatório (Martins *et al.*, 2011; Tiago *et al.*, 2012). Em estudos recentes essa levedura promoveu uma melhora na inflamação intestinal causada por indução

química por meio do sulfato de sódio dextrana (DSS) em modelo murino de colite, reduzindo parâmetros inflamatórios e melhora nos aspectos histológicos (Tiago *et al.*, 2015).

5 Frente a tais características de *S. cerevisiae* UFMG A-905 acredita-se que esta levedura enriquecida com Se possa ter efeitos benéficos contra os sinais e sintomas da mucosite aliando suas funções probióticas às funções antioxidantes do Se.

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada à modulação da microbiota intestinal normal por adjuvantes microbianos vivos chamados de probióticos. O interesse no uso destes agentes microbianos vivos tem aumentado nesses últimos anos com o propósito de prevenção ou tratamento de um grande número de desordens gastrointestinais. A grande vantagem da terapia com os probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes, já que os mecanismos benéficos destes micro-organismos são basicamente os mesmos da microbiota normal do corpo humano. O que se faz neste caso é a utilização daqueles que possuem eficácia comprovada, podendo ser constituintes normais da microbiota, como é o caso das bifidobactérias e dos lactobacilos, ou não, como a levedura *S. boulardii*.

Nosso grupo vem se empenhando na seleção de uma levedura do bioma brasileiro que tenha função probiótica, pois a única levedura disponível no mercado para uso como probiótico em seres humanos é a *S. boulardii* (nome comercial usado no Brasil: Floratil®). Como é um medicamento patenteado pelo Laboratório Biocodex, da França, e comercializada no Brasil pela MERCK S.A., seu valor de venda ao consumidor é elevado. Desse modo, é de grande interesse a seleção de uma levedura de origem nacional que desempenhe as mesmas funções e tenha custo reduzido, o que já vem sendo proposto por nosso grupo. Devido a esse fato, nosso grupo vem desde 2002 procurando outras leveduras para uso como probióticos. Resultados prévios em nosso laboratório mostraram que a *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de reduzir a ação de alguns enteropatógenos quando utilizada como probiótico. A levedura também foi capaz de aumentar a resposta imune do hospedeiro e diminuir a translocação bacteriana em dois modelos murinos.

O Se é considerado um metal antioxidante muito usado como suplemento em formulações multivitamínicas na medicina humana e veterinária. Como um aditivo alimentar, o agente probiótico é disponível, também, na forma enriquecida com Se, que é um elemento traço com propriedades antioxidantes capazes de modular a resposta imune e a resposta inflamatória. No Brasil é produzido o Selemax® (Biorigin, Lençóis Paulista, SP), que é uma levedura inativa seca que contém níveis elevados de Se orgânico (1000 e 2000 ppm). Obter um probiótico

capaz de incorporar Se em concentrações adequadas para o organismo animal, que além de fornecer os benefícios já conhecidos dos probióticos, exerça função antioxidante no organismo hospedeiro, seria de grande eficácia no combate aos processos inflamatórios, uma vez que as moléculas oxidantes participam do processo inflamatório. Os danos causados pelas ROS apresentam um papel na patogenia de diferentes doenças como: câncer, doenças cardiovasculares, alergias, aterosclerose e, também, na mucosite. Além disso, tratando-se de um organismo saudável, esta combinação pode ajudar a proteger o corpo contra o envelhecimento celular (considerado resultado do acúmulo de lesões decorrente dos radicais livres) e uma série de doenças, incluindo alguns tipos de câncer, quando este for usado como suplemento nutricional. Nesse contexto, nossos dois principais objetivos são: (i) avaliar a incorporação de Se pela levedura utilizando uma abordagem proteômica, e (ii) verificar o seu potencial para uso como um probiótico suplementado com Se em modelo animal com mucosite induzida por 5-FU.

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

Avaliar a incorporação de Se pela levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905, e o
5 efeito anti-inflamatório dessa incorporação em modelo experimental de mucosite
induzida por quimioterápico.

3.2.Objetivos específicos

10 3.2.1. Objetivo específico 1: avaliar o efeito do enriquecimento da levedura com Se, analisando:

1. A capacidade de incorporação de Se pela levedura e a estabilidade
dessa incorporação;
2. A tolerância das células da levedura a diferentes concentrações de
15 Se;
3. A influência do Se na formação de radicais livres nas células de
levedura;
4. O efeito do Se em proteínas, por análise proteômica, das células da
levedura submetidas a diferentes concentrações de Se.

20

3.2.2. Objetivo específico 2: avaliar o efeito da levedura enriquecida (ou não) com Se em modelo de mucosite induzida por 5-FU, analisando:

1. Sinais clínicos da mucosite:
 - a. Perda de peso;
 - 25 b. Consumo de água e comida
2. A participação de células inflamatórias (eosinófilo e neutrófilos), bem como
os seus mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas) no jejuno,
comparando animais com mucosite induzida, tratados ou não com a
levedura enriquecida de Se, e animais controles. Para isso utilizamos os
30 seguintes parâmetros:
 - a. Ensaio enzimático para as enzimas MPO e EPO para
quantificação indireta de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente;
 - b. Permeabilidade intestinal;
 - c. Perfil de citocinas;

d. Histopatologia do intestino.

3. Danos aos tecidos causados por estresse oxidativo em modelo de mucosite, avaliando:

a. Peroxidação de lipídios;

b. Concentração de nitritos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Efeito do enriquecimento com Se nas células da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905

5 4.1.1. Micro-organismo

A levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 pertence à coleção do Laboratório de Agentes Bioterapêuticos, e está em fase de proteção pelo CTIT (Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica) da UFMG.

10 4.1.2. Desenho experimental

Um pré-inóculo da levedura foi crescido em caldo YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) *overnight*, a 37°C, em uma incubadora a 200 rpm (rotações por minuto). Em seguida foi transferido para uma nova cultura de caldo YPG e crescido nas mesmas condições de temperatura e
15 agitação, porém, com diferentes tratamentos para as análises de ativação neutrônica, peroxidação de lipídios, resíduos sulfidrílicos totais, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), análise proteômica e curva de crescimento, na presença ou não de selênio.

20 4.1.3. Capacidade de incorporação de selênio em diferentes concentrações

Após o crescimento nas condições descritas no item 4.1.2, as células foram transferidas para o meio YPG acrescido de 0, 4, 8, 20, 35 e 100 mg/L de selenito de sódio e também na situação controle (ausência de selenito de sódio) durante 24 h, para realização da análise por ativação neutrônica. Após o tratamento, as
25 células foram recuperadas por filtração a vácuo usando filtros de nitrocelulose de 0,45 µm de porosidade e 47 mm de diâmetro e transferidas para os tubos plásticos próprios para análise em reator nuclear. Em seguida foram secas em estufa a 70°C por 72 h, pesadas e submetidas à análise por ativação neutrônica.

30 4.1.4. Avaliação da capacidade de incorporação e dessorção de selênio pela levedura

A levedura foi crescida conforme descrito anteriormente no item 4.1.2, porém apenas nas concentrações de 20 e 100 mg/L de selenito de sódio e, também, na situação controle. Parte das células foi coletada para determinar a

quantidade de Se incorporado. Nesta análise foi utilizado o meio YNB (Yeast Nitrogen Base), um meio com poucos nutrientes para que não houvesse interferência de incorporação de Se. Para avaliar se a levedura perdeu o Se incorporado, após crescimento e incorporação de Se, a levedura foi transferida para meio sem Se e, após 24 e 48 horas de crescimento neste meio, as células foram coletadas, filtradas e transferidas para os tubos de análise por ativação neutrônica.

4.1.5. Análise por ativação neutrônica

A análise por ativação neutrônica tem como princípio a indução de radioatividade artificial, em uma amostra, por meio da irradiação com nêutrons, e posterior medida da atividade induzida mediante a detecção dos picos gama característicos do isótopo que se deseja determinar por meio da espectrometria gama. Os fenômenos físicos nos quais está fundamentada esta análise são as propriedades do núcleo, radioatividade e a interação da radiação com a matéria, via reação de nêutrons-gama (n, γ). Os raios gama emitidos, denominados de raios gama de decaimento, possuem energias que são características de cada radionuclídeo. Assim, quando detectados por espectroscopia gama, podem ser utilizados para identificar e quantificar os elementos químicos presentes em uma amostra (Menezes *et al.*, 2006). As amostras foram irradiadas no reator TRIGA MARK I IPR-R1 e a análise por ativação neutrônica foi realizada no Laboratório de Radioquímica do CNEN/CDTN. As células foram irradiadas durante 8 h e, posteriormente, as amostras foram submetidas à espectrometria gama, os picos característicos do Se foram determinados e usados para a determinação da quantidade do elemento presente na célula.

4.1.6. Análise por microscopia eletrônica de transmissão

A partir de cultivos celulares com 100 mg/mL de selenito de sódio e situação controle, retirou-se 1 mL de cada amostra que foi centrifugado e em seguida ressuspenso em 1 mL de água destilada estéril. Uma alíquota destas suspensões foi diretamente adicionada a “grade ME” (cobertas com uma fina camada de uma substância coloidal), desidratadas em temperatura ambiente e, após este período, foram visualizadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM) (Lamberti *et al.*, 2011).

4.1.7. Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC). Após o crescimento celular como descrito no item 4.1.2, foi verificada a densidade ótica (DO) da cultura em espectrofotômetro, a 600 nm. Os experimentos foram iniciados com uma DO de 0,1 e as células foram crescidas em 10 mL de meio contendo 0, 4, 8, 20, 35 e 100 mg/L de selenito de sódio, além do grupo controle (ausência de Na_2SeO_3). As amostras foram coletadas após 9 h de incubação com Se. As UFC foram determinadas pelo plaqueamento da suspensão das células de levedura em meio YPG acrescido de ágar, e depois de 72 h de incubação a 30°C, o número de colônias foi contado. Os dados foram expressos em UFC/mL.

4.1.8. Influência do selênio na formação de radicais livres nas células de levedura

4.1.8.1. Preparo dos extratos celulares

Após tratamento das células com Se durante 24 h nas concentrações de 20 e 100 mg/L de selenito de sódio, as células foram coletadas por filtração, como descrito anteriormente, e o *pellet* obtido foi ressuspenso em tampão de lise (tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM e PMSF 1 mM). A ruptura das células foi feita com pérolas de vidro e agitação em *vortex* por seis ciclos de 30 s, intercalados com períodos de repouso em gelo. Esse procedimento foi realizado para a determinação da peroxidação lipídica e resíduos sulfidrílicos totais.

4.1.8.2. Peroxidação de lipídios nas células

A concentração dos lipídios peroxidados foi realizada pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) se ligam ao malondialdeído (MDA) um dos subprodutos da peroxidação lipídica (Lushchak & Gospodaryov, 2005). A análise da quantidade de TBARS é utilizada como um índice de estresse oxidativo.

Após a obtenção do extrato celular obtido no item 4.1.8.1, a 720 μL do sobrenadante previamente separado por centrifugação, foi adicionado 80 μL de ácido tricloracético (TCA, concentração final de 10%). A suspensão foi incubada em gelo durante 30 min. Em seguida, foi centrifugada (3000 rpm por 5 min) e a

700 μL do sobrenadante foi adicionado 700 μL de solução de TBA (0,5% de ácido tiobarbitúrico preparado em TCA 20%), que foi aquecida por 60 min a 100°C. Em seguida, a absorvância foi determinada espectrofotometricamente a 532 nm. As medidas foram corrigidas pela turbidez inespecífica pela subtração da absorvância a 600 nm. O índice de peroxidação lipídica foi expresso em picomoles de MDA por mg de proteína. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

4.1.8.3. Resíduos sulfidrílicos totais das células

Os resíduos sulfidrílicos totais são uma quantificação indireta da glutathiona reduzida e foram determinados pelos métodos de Ellman (1959) e Davidson & Schiestl (2001), usando 5-5´dithio-bis 2-ácido-nitrobenzoico (DTNB). Na presença do grupamento tiol livre a solução de DTNB forma 5-mercapto-2-nitrobenzoico, produzindo uma coloração amarela característica que pode ser determinada espectrofotometricamente a 412 nm.

Os extratos celulares foram preparados de acordo com o item 4.1.8.1. Foi utilizado 0,5 mg de proteína diluída em tampão 0,1 M de fosfato de sódio pH 7,0. Foi retirada uma alíquota de cada preparação que foi adicionada em tampão 0,01 M fosfato de sódio, pH 8,0 e reagente Ellman (0,01 M DTNB preparado em tampão 0,1 M de fosfato de sódio pH 7,0). A absorvância foi determinada a 412 nm, após 5 min de incubação à temperatura ambiente. O coeficiente de extinção molar para o DTNB é $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e foi usado para determinar a concentração de resíduos sulfidrílicos totais. Os resultados foram expressos em micromoles de resíduos sulfidrílicos por mg de proteína por mL ($\mu\text{moles/mg}$ proteína) e a dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

4.1.9. Efeito do selênio em proteínas, por análise proteômica, de células de leveduras submetidas a diferentes concentrações de selênio

4.1.9.1. Curva de crescimento

Após crescimento como descrito no item 4.1.2, foi verificada a DO da cultura em espectrofotômetro, a 600 nm. Os experimentos foram iniciados com uma DO de 0,1 e as células foram crescidas em 50 mL de meio contendo 100 mg/L de selenito de sódio, além do grupo controle. A cada 2 h em um período de 24 h, uma alíquota de 100 μL foi retirada e colocada em 900 μL de tampão fosfato

salino (PBS). O crescimento foi seguido pela medida da turbidez da suspensão a 600 nm, em espectrofotômetro. A curva de crescimento foi medida para estabelecer o tempo de crescimento para a análise proteômica.

5 **4.1.9.2. Preparo dos extratos celulares para análise proteômica**

Para esta análise, a concentração de selenito de sódio escolhida foi de 100 mg/L e situação controle crescidos por 8 h (determinado pela análise da curva de crescimento). Após realização do item 4.1.2, as células foram coletadas por centrifugação (4000 rpm a 4°C, 20 min) lavadas 2 vezes com solução de NaCl 10 0,85%, o sobrenadante descartado e as células estocadas a -20°C.

4.1.9.3. Obtenção de extratos celulares

As células foram ressuspensas em tampão TE (50 mM Tris-HCl, pH 7,3, 1 mM EDTA). Após adição de volume igual de pérolas de vidro, as células foram 15 vortexadas por 15 ciclos de 1 min e mantidas em gelo. Os restos celulares e as perlas de vidro foram removidos por centrifugação a 40.000 rpm a 4°C, durante 20 min. O sobrenadante foi coletado e submetido à ultracentrifugação, 43.000 rpm a 4°C, durante 1 h. O sobrenadante foi coletado e submetido à dosagem de proteína, com o auxílio do 2-D Quant Kit (Amersham Bioscience). Em seguida, as 20 amostras foram submetidas à concentração das proteínas de interesse utilizando filtro AMICON (10.000 Da) e centrifugações sucessivas (40.000 rpm a 4°C, 15 min) para que se obtivesse um concentrado proteico de 1 mL.

4.1.9.4. Precipitação com metanol e clorofórmio

25 Foi aliquoteado um volume correspondente a 1 mg de proteína das amostras e em seguida adicionado 800 µL de metanol. As amostras foram submetidas a agitação em *vortex* e, em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio. As amostras foram submetidas, novamente, a agitação em *vortex*, 600 µL de água miliQ foram adicionados, e as amostras foram submetidas novamente a agitação 30 em *vortex*. Após esta etapa as amostras foram submetidas à centrifugação a 14.000 g por 5 min, o sobrenadante descartado e foram adicionados 800 µL de metanol. As amostras foram submetidas a agitação fina a fim que se obtivesse uma amostra homogênea que foi centrifugada a 14.000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* secado à temperatura ambiente em fluxo

laminar até evaporar todo metanol. Após seco, o *pellet* foi ressuspenso em 200 μ L de Rabiloud (solução de reidratação), e a proteína obtida foi quantificada utilizando Quant Kit (Amersham Bioscience).

5 4.1.9.5. Primeira dimensão – Focalização isoeétrica (IEF)

A IEF foi realizada utilizando-se uma *strip* IPG de 13 cm (Amersham Biosciences, GE Healthcare) com um gradiente de pH linear de 3 a 10, em um focalizador IPGphor (Amersham Biosciences), em uma temperatura de 20°C. Foram solubilizadas 250 μ g do extrato proteico em tampão Rabilloud (6,5 M ureia, 2,2 M tiourea, 4% CHAPS, 5 mM Tris-HCl) em quantidades suficientes para que se obtivesse um volume de 260 μ L. Acrescentaram-se à solução anfolina (0,5% v/v) e DeStreak (1,2% v/v), dois agentes redutores (Amersham Biosciences). A solução foi inserida em um *strip* holder onde foi inserida a *strip* com o gel em contato com a solução e, em seguida, colocou-se óleo mineral. A IEF foi realizada utilizando-se os parâmetros da Tabela 1.

Tabela 1: Programa da focalização isoeétrica *strips* 3-10.

Etapas	Voltagem (V)	Tempo
<i>Rehydration</i>	–	10 min
<i>Step-n-hold</i>	30 V	4 h
<i>Step-n-hold</i>	60 V	4 h
<i>Step-n-hold</i>	500 V	1 h
<i>Step-n-hold</i>	1500 V	1 h
<i>Gradient</i>	8000 V	1 h
<i>Step-n-hold</i>	8000 V	50000 Vhrs

4.1.9.6. Segunda dimensão - SDS-PAGE

20 - Equilibração da *strip*:

Antes de realizar a segunda dimensão, foi realizada a equilibração da *strip*. Em um *strip-holder* foi adicionado 1 mL de tampão de equilibração no qual foi pré-adicionado DTT (2% p/v), a *strip* foi posicionada com o gel virado para baixo em contato com a solução por 15 min. Após essa etapa, a *strip* foi retirada do *strip-holder*, o tampão desprezado e foi adicionado 1 mL de tampão de equilibração no

qual foi pré adicionado iodoacetamida (4,5% p/v), e a *strip* foi colocada novamente no *strip-hold* por 15 min.

- SDS-PAGE:

5 Géis de SDS-PAGE foram colados entre dois vidros (18x16 cm) separados com espaçadores de 1 mm fechados lateralmente com morcetes. Para cada amostra foram utilizados géis SDS-PAGE compostos como mostra a Tabela 2. As *strips* foram colocadas sob o gel imersas em uma solução de agarose (para selar o gel) e em seguida o padrão de peso molecular Low Mr Electrophoresis Calibration Kit (GE-Healthcare). As condições de corrida para cada gel foram 10 11°C, 600 V, voltagem constante, 20 mA/gel, 60 W por 15 min, e 11°C, 600 V, voltagem constante, 40 mA/gel, 80 W por aproximadamente 2 h. Os géis foram corados automaticamente utilizando *Processor Plus* (Amersham Biosciences) com corantes frescos de acordo com Neuhoff (Colloidal Comassie Blue) (Neuhoff *et al.*, 1988). 15

Tabela 2: Composição dos géis SDS-PAGE.

Substância	Quantidade (2 géis)
Duracryl	23,62 mL
Água	22,50 mL
Tris/HCl (1,5 M, pH 8,6)	15,5 mL
SDS 10% (p/v)	650 µL
APS 10% (p/v)	187,5 µL
TEMED	31,25 µL

4.1.9.7. Análise de imagem

20 Os géis foram digitalizados em *Personal Densitometer SI* (Amersham Biosciences). A imagem dos géis foi feita no Progenesis PG 220 software (Non Linear Dynamics). Os *spots* foram detectados automaticamente usando o 2005 detection software algorithm. Em seguida os géis foram secados com GD 2000 Vacuum Gel Drier System (GE Healthcare).

4.1.9.8. Espectrometria de massa

Os *spots* de proteínas foram retirados dos géis secos e reidratados com água MiliQ e em seguida lavados 2 vezes com acetonitrila 50% v/v, 25 mM NH₄CO₃ 100% v/v, e em seguida foram secos a vácuo. As proteínas foram digeridas utilizando tripsina modificada (Promega, Madison, WI, EUA) e colocadas em placa para MALDI, como descrito por Hewitson e colaboradores (2008). As amostras foram então submetidas à análise de massa por MALDI MS/MS utilizando o instrumento Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) no modo refletor positivo, equipado com um analisador de massa CID-MS/MS. A calibração interna no modo MS/MS foi feita com *tryptic autolysis products* (m/z 842.509 e 2211.104). O espectro de massa obtido foi confrontado com o banco de dados MASCOT (Matrix Science version 2.1) e a busca foi realizada contra o banco de dados mais recente da NCBI. Os parâmetros de busca foram ajustados para permitir uma clivagem perdida, modificações variáveis de oxidação da metionina e carboxiamidometilação da cisteína e tolerância para desvio de massa de 100 ppm. O limiar de significância foi estabelecido em p<0,05 e foi necessário que cada proteína apresentasse pelo menos um peptídeo com um valor estatístico de e-value <0,05.

4.2. Avaliação do efeito da levedura enriquecida com selênio em modelo de mucosite induzida por 5-FU

4.2.1. Animais utilizados

Foram utilizados camundongos fêmeas convencionais, de seis a oito semanas de idade, da linhagem *Swiss*, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Para os experimentos, os camundongos foram mantidos em mini-isoladores de modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), no biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, nível NB2.

Os animais receberam, *ad libitum*, ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água filtrada. Um ciclo diurno/noturno de 12 h foi mantido no biotério, assim como aeração, umidade (60-80%) e temperatura (22±1°C) também foram controladas.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (0,6 mL de cetamina 100 mg/mL; 0,4 mL de xilazina 20 mg/mL e 4 mL de solução salina NaCl 0,9%) (Wirtz *et al.* 2007).

5

4.2.3. Indução de mucosite

Para indução de mucosite, foi utilizado o quimioterápico 5-FU. Os animais receberam 300 mg/kg de peso corpóreo da droga por via intraperitoneal em dose única. Eles foram sacrificados três dias após o início da indução (Maioli *et al.*, 2014).

10

4.2.4. Tratamento com a levedura enriquecida com selênio

Os animais receberam 1×10^8 UFC da levedura enriquecida com Se (o que equivale a 3,3 μ g Se/dia) durante 14 dias (10 dias antes da indução da doença, e durante o 4 dias de indução), sendo a dose recebida de Se calculada de acordo com Reagan-Shaw e colaboradores (2008) que utiliza a área de superfície corporal (ASC) e o metabolismo basal do animal estudado como método de normalização.

15

4.2.5. Desenho experimental

Os animais foram divididos em 6 grupos, sendo 5 animais por grupo e três repetições: (i) animais controle, (ii) animais controle tratados com a levedura, (iii) animais controle tratados com a levedura enriquecida com Se, (iv) animais com mucosite, (v) animais tratados com a levedura + mucosite, e (vi) animais tratados com a levedura enriquecida + mucosite. Os animais experimentais dos grupos tratados com a levedura receberam um inóculo diário de 10^8 células por inoculação intragástrica, iniciado dez dias antes da indução da mucosite e durante o desenvolvimento da doença. Os animais dos grupos controle receberam inóculos de salina (0,9% NaCl) estéril de acordo com o esquema descrito para os respectivos grupos experimentais. A presença da levedura foi verificada periodicamente nas fezes dos animais, por plaqueamento em meios específicos (Martins *et al.*, 2009). Após indução da mucosite, o peso dos animais e a quantidade de água e ração consumidos foram avaliados a partir do dia 0 até o dia 3. Ao final do experimento, todos os animais foram sacrificados para análise

20

30

de níveis de mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO), quimiocina e marcadores de estresse oxidativo (TBARS e NO). Além disso, foi avaliado o aspecto intestinal no nível histológico e a alteração da permeabilidade intestinal.

5 **4.2.6. Determinação da permeabilidade intestinal**

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no plasma após a administração oral de ^{99m}Tc-DTPA (Ácido Dietilenotriaminopentacético marcado com Tecnécio). No dia 3 do experimento, todos os camundongos receberam, por gavagem, 0,1 mL de solução contendo
10 18,5 MBq (Megabequerel) de ^{99m}Tc-DTPA. Após 90 min, os animais foram anestesiados e tiveram o sangue coletado e pesado. Em seguida, foi realizada a determinação da radioatividade em cintilador (Viana *et al.*, 2010) e os dados foram expressos em contagem por minuto (CPM)/g de sangue.

15 **4.2.7. Análises histopatológicas**

Após o sacrifício, o processamento do jejuno foi realizado de acordo com o método descrito por Arantes e colaboradores (2004). Seguindo essa metodologia, os intestinos foram cortados longitudinalmente, estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda anti-mesentérica, removendo
20 todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Esses foram transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin por um período de 30 min para pré-fixação. Em seguida, os órgãos pré-fixados foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocambos) da porção distal em direção à proximal. Os rolos foram
25 fixados por imersão em solução de formol a 4% por 18 a 20 horas. O material foi então processado para inclusão em parafina e secções de 4 µm de cada amostra foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas microscópicas foram examinadas por patologista e lesões da mucosa e muscular foram avaliadas usando um sistema de classificação histopatológica descrito por Soares e
30 colaboradores (2008). Para a análise morfométrica, dez imagens com ampliação de 10X por espécime foram obtidas utilizando microscópio Olympus BX51 acoplado à câmera digital por meio do software Imagem-Pro Express 4.0 (Media Cybernetics, MD, EUA). Para cada imagem, o comprimento de pelo menos 4 vilosidades foi mensurado desde sua base até seu ápice utilizando o software

ImageJ 1.45S (NIH, EUA) e os dados foram expressos em μm . Dados de diferentes grupos foram comparados por análise unidirecional da variância (ANOVA), software GraphPad InStat (San Diego, EUA) e valores de probabilidade de 0,05 ou menos foram considerados significativos.

5

4.2.10. Ensaio de MPO

10 aliação da atividade da enzima MPO é utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Utilizou-se um ensaio para dosagem dessa enzima em tecidos previamente homogeneizados (Souza *et al.*, 2000), com algumas modificações.

Fragmentos do jejuno dos animais foram removidos e congelados a -80°C. Após o descongelamento, os tecidos (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foram homogeneizados em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl; 0,02 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$; 0,015 M $\text{Na}_2\text{-EDTA}$), utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic), centrifugados a 10.000 rpm por 15 min e os precipitados foram submetidos à lise hipotônica (500 μL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 s após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação os precipitados foram ressuspensos em tampão NaH_2PO_4 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% e re-homogeneizados. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e a atividade da mieloperoxidase nestes precipitados ressuspensos foi calculada pela medida das alterações na DO a 450 nm utilizando tetrametilbenzidina (TMB) (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados foram expressos como concentração da enzima presente em 100 mg de tecido.

30

4.2.11. Atividade da enzima EPO

A atividade da enzima EPO como quantidade relativa de eosinófilos no tecido foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito anteriormente

por Strath *et al.* (1985). A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido é utilizada como uma maneira indireta de estimar a eosinofilia tecidual.

Para cada 100 mg de tecido de jejuno pesado, foi adicionado 1,9 mL de PBS 5X (pH 7,2). Em seguida o tecido foi homogenizado e centrifugado a 12.000 g por 10 min e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido à lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min, e o sobrenadante novamente desprezado. O *pellet* foi ressuspendido em 1,9 mL de PBS (pH 7,4), contendo 0,5% de HTAB. Essa solução foi novamente homogeneizada e 1 mL do homogenato foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A amostra foi, então, centrifugada a 12.000 g por 15 min a 4°C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS) foi incubada com 75 µL de substrato (1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, OPD, em tampão Tris-HCl - 0,075 µM pH 8 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM). A placa foi incubada no escuro, em temperatura ambiente, por aproximadamente 30 min, e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 492 nm.

4.2.12. Dosagem da quimiocina CXCL1/KC e da citocina IL-1β

Para avaliar os níveis de CXCL1/KC e IL-1β, fragmentos do jejuno com 100 mg foram homogenizados com 1 mL de solução de extração de citocinas (PBS contendo um coquetel de anti-proteases: 0,1 mM PMSF; 0,1 mM benzethonium chloride; 10 mM EDTA e 20 Kallikrein Inhibitor unidades de aprotinina A) utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic) (Martins *et al.*, 2013). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 min a 12.000 g e os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem. A quantificação das citocinas foi realizada pelo método de ELISA e os kits para as dosagens foram obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas.

4.2.13. Avaliação dos parâmetros oxidativos

Para análise do estresse oxidativo, o jejuno foi retirado (100 mg) e então homogeneizado com 1 mL de PBS 1X gelado, centrifugado a 12.000 g por 10 min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi separado para as análises descritas
5 abaixo.

4.2.13.1. Avaliação da peroxidação lipídica

A medida dos metabólitos, reativos ao ácido tiobarbitúrico, foi realizada em microplacas pelo método de TBARS (Buege & Aust, 1978). Para isso, ao
10 sobrenadante do jejuno (250 µL) foi adicionado 500 µL da solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl 0,25 N). As amostras foram mantidas em banho Maria fervente por 15 min e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foram adicionados 750 µL de álcool butílico, e os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram
15 centrifugadas a 3000 rpm por 10 min à temperatura ambiente, e 200 µL do sobrenadante foram plaqueados, em duplicata. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535 nm, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no jejuno (Lowry *et al.*, 1951).

20 4.2.13.2. Determinação da concentração de nitritos

A produção de NO (óxido nítrico) foi determinada indiretamente pela medida da concentração de nitritos baseado na reação de Griess (Chen *et al.*, 2000). Primeiramente, 100 µL do homogenato de tecido foram incubados com 100 µL do reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% naphthylethilenediamina em
25 2,5% ácido fosfórico) em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, a absorbância das amostras foi medida por espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão entre 5 e 240 µM foi utilizada para quantificar a concentração de nitrito das amostras e o resultado foi expresso em µM.

30 4.3. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e analisados usando teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San

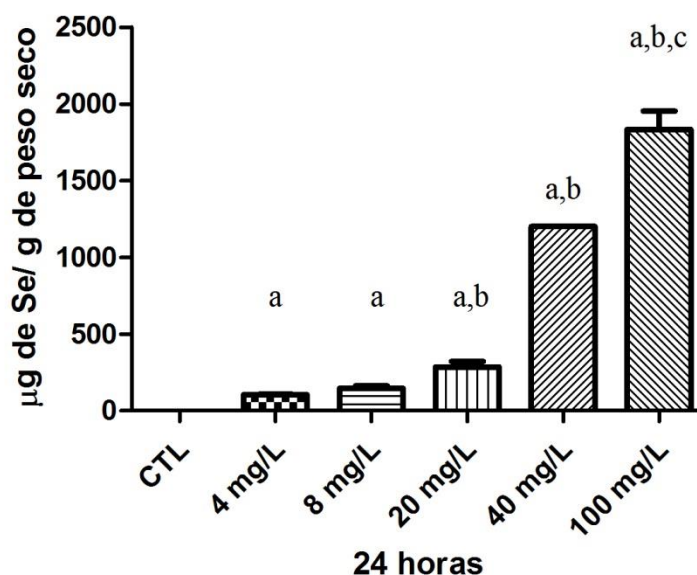
Diego, Califórnia, EUA) e consideradas significativas as diferenças que apresentaram $p < 0,05$. Os significados estatísticos dos resultados obtidos na análise proteômica foram avaliados com a utilização do teste “t” de Student, utilizando 0,05 como limiar de confiança.

5. Resultados e Discussão

5.1. Efeito do enriquecimento com selênio nas células da levedura *S. cerevisiae* UFMG-A 905

5.1.1. Verificação da capacidade de incorporar selênio

Para verificar a capacidade da levedura em incorporar Se, as células de levedura foram crescidas em meio com diferentes concentrações de Se. Como esperado, a célula da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 não apresentou Se na situação controle. A capacidade de incorporação de Se variou de acordo com a concentração inicial de Se no meio, quando incubado com 4 e 8 mg/L de selenito de sódio não foi observado diferença significativa entre as duas concentrações. Quando a concentração aumentou para 20 mg/L, a levedura foi capaz de incorporar mais Se do que quando incubada com concentrações inferiores. O mesmo ocorreu quando a concentração aumentou para 40 mg/L, a capacidade de incorporar Se foi maior que a 20mg/L e, na concentração de 100 mg/L, a capacidade de incorporação foi maior que a 40 mg/L (Figura 2).



20 **Figura 2:** Determinação da quantidade de selênio incorporado pela levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 h de crescimento em meio YPG contendo selênio, sendo (a) significativo em relação ao controle, (b) significativo em relação a 4 e 8 mg/L, (c) significativo em relação a 40 mg/L ($p < 0,05$).

Quando avaliado se essa levedura é capaz de manter o Se dentro da célula, observamos que após 24 h em meio sem a presença de Se a concentração deste nas células permanece a mesma e diminui apenas na concentração de 100 mg/L, 48 h após terem incorporado Se (Figura 3).

5

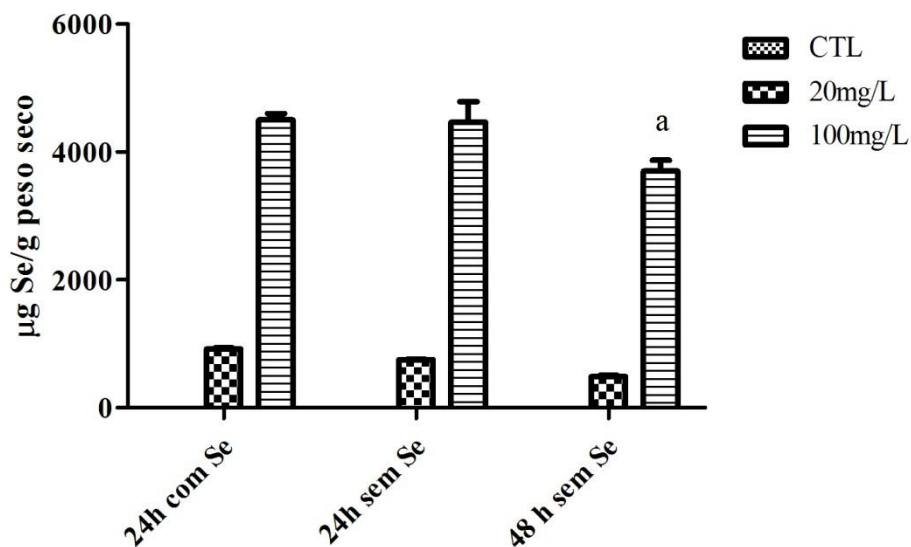


Figura 3: Determinação da quantidade de selênio incorporado após 24 h com Se e a ocorrência de dessorção de Se pela levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 e 48 h de crescimento em meio YNB sem selênio, sendo (a) significativo em relação a 24 h de incubação sem selênio ($p < 0,05$).

10

Outro fato observado foi que quando houve a mudança do meio YPG para o YNB a levedura incorporou mais Se nas concentrações de 20 e 100 mg/L. Suhajda e colaboradores (2000) observaram resultados de incorporação de Se semelhantes aos obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, ao incubar células de *S. cerevisiae* com 30 mg/L de selenito. Foi obtida uma incorporação na faixa de 1200-1400 µg/g de peso seco. Schrauzer (2006) observou a capacidade de leveduras em incorporar Se, sendo que sua incorporação depende da quantidade de metionina presente na célula, pois o Se se liga ao aminoácido metionina formando a Se-Met. No entanto, a total substituição de metionina por Se-Met não ocorre, e, sim, a incorporação aproximada da metade de total de Se-Met presente na célula. Leveduras armazenam Se na forma de Se elementar como um mecanismo de desintoxicação e armazena este elemento nos vacúolos das células de forma semelhante como o fazem em presença de metais pesados

15

20

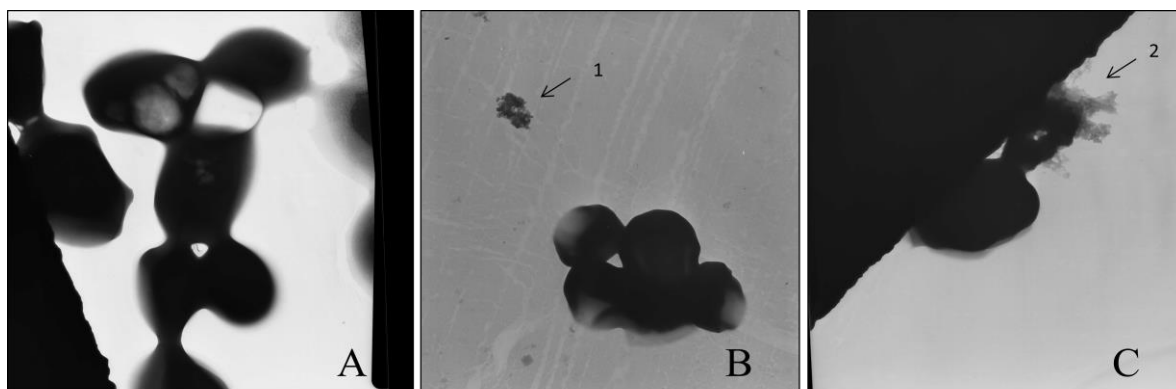
(Kieliszek *et al.*, 2015). Alguns estudos demonstraram que uma pequena parte do Se presente no vacúolo pode ser transportado para o citoplasma da levedura usando a glutatona reduzida e, em seguida, para fora da célula (Lazard *et al.*, 2011). Além disso, de acordo com Zhang e colaboradores (2012), em condições de pouco oxigênio, as leveduras têm a capacidade de remover o excesso de íons de Se usando vesículas transportadoras provenientes do complexo de Golgi. Observando a perda de Se pela célula, é possível que o excesso de Se metabolizado pela célula tenha sido desorvido pela levedura e que, possivelmente, a levedura tem um limite de metabolização e acúmulo de Se.

10

5.1.3. Dectecção de selênio na parede celular por microscopia eletrônica de transmissão

Após 8 h de crescimento em meio YPG contendo 100 mg/L de selenito de sódio foram observados depósitos do sal de Se no meio e as células estavam com a parede celular íntegra como na situação controle (mostrado pela seta 1, Figura 4). No entanto, após 24 h de incubação, foi observado acúmulo de sal de Se na parede celular e uma modificação na morfologia das células detectada por TEM (mostrado pela seta 1, Figura 4).

15



20

Figura 4: Análise por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Células na situação controle. (B) Células após 8 h de crescimento na presença de 100 mg/L de selênio no meio. (C) Células após 24 h de crescimento na presença de 100 mg/L de selênio no meio. A seta 1 demonstra os sais de Se presente no meio externo e a seta 2 indica os depósitos de Se na parede da levedura.

25

Também foi observado uma coloração avermelhada na cultura celular após 24 h (resultado não mostrado). Kieliszek e colaboradores (2015) observaram a presença da coloração vermelha na biomassa celular de *Candida utilis* após o

cultivo em meio contendo 20 e 30 mg/L de selenito de sódio e atribuíram essa coloração à presença de selênio elementar [Se(0)] no interior da célula. Segundo os autores, a transformação em Se elementar é parte do processo metabólico para redução da toxicidade do selênio no interior das células. Situação semelhante foi observada por Lamberti e colaboradores (2012) quando incubaram *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM com 4,38 mg/L de selenito de sódio, e após a TEM observaram depósitos de Se(0) na parede celular da bactéria e coloração avermelhada na biomassa celular. Os autores atribuíram o fato de *L. reuteri* LB2 BM em sobreviver ao Se em concentrações superiores a 4 mg/L a seus mecanismos de desintoxicação. Tal estratégia já foi descrita em outras bactérias do ácido láctico (LAB) e tal fenômeno ocorre em *L. reuteri* LB2 BM, só em excesso de Se, durante a fase estacionária de crescimento, e provoca a formação de depósitos de Se elementar na parede. Segundo os autores esse acúmulo de Se(0) na parede é o que confere a coloração vermelha à biomassa. Xia e colaboradores (2007) sugerem que após a inserção de Se(IV), em proteínas como Se-C ou Se-Met, o excesso de Se(IV) que é tóxico é convertido a Se(0) para ser removido da célula, permitindo uma atenuação dos seus efeitos tóxicos. Assim como bactérias, leveduras também possuem um mecanismo de desintoxicação de Se. De acordo com sua química, sugere-se que o Se se encontre na forma de R-SeH, que são compostos que correspondem aos R-SH, onde o átomo de Se é substituído pelo átomo de S. Em leveduras, o Se(IV) e o Se(III) são assimilados pela mesma via do S com ativação do selenato por ATP sulfúrilase e subsequente conversão a Se-Met (Rosen & Liu, 2009). Assim, com os resultados obtidos, possivelmente os depósitos observados na parede celular da levedura após 24 h de incubação de Se se tratam de Se(0) decorrentes da redução do Se inorgânico sendo eliminado da célula. Não descartamos a possibilidade de também serem formados Se(0) no interior da célula, já que a levedura, mesmo em meio que não contém Se, permanece com o Se em seu interior até 48 h de crescimento na concentração de 20 mg/L e 24 h na concentração de 100 mg/L, como demonstrado na figura 3.

5.1.4. Análise da viabilidade celular

Após 9 h de incubação com Se, foi observada uma significativa diminuição do crescimento das células de levedura na concentração de 100 mg/L de selenito

de sódio (Figura 5), sendo esta concentração escolhida para prosseguir com os experimentos de análise proteômica. Suhajda e colaboradores (2000) observaram que o aumento da concentração de selenito no meio afetou o crescimento de levedura. Essa diminuição do crescimento provavelmente ocorre devido à toxicidade do Se para as células de levedura.

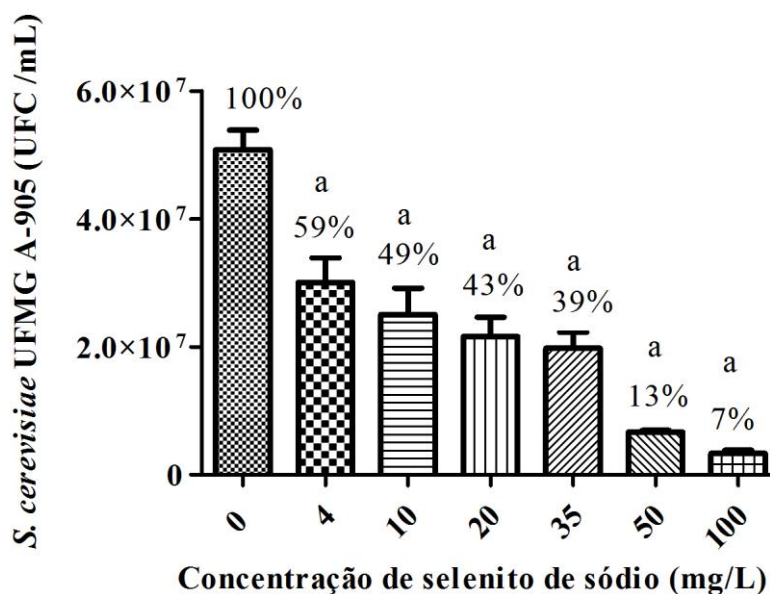


Figura 5: Contagem em placa de células de *S. cerevisiae* UFMG A-905 incubadas em diferentes concentrações de selenito de sódio, sendo (a) significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

10

5.1.5. Influência do selênio na formação de radicais livres nas células da levedura

5.1.5.1. Determinação da peroxidação lipídica

Membranas são constituintes celulares ricos em lipídeos e são alvos comuns das ROS gerados no estresse oxidativo e, em geral, o maior dano causado a esses lipídios é a peroxidação. A oxidação da membrana lipídica ocorre por uma cadeia de reações com radicais livres (Li *et al.*, 2009). Para avaliar se a incorporação de Se pelas células leva à peroxidação dos lipídeos, foi feita a determinação da quantidade de lipídios peroxidados. As concentrações de Se utilizadas foram previamente selecionadas de acordo com os resultados apresentados anteriormente.

Na situação controle a levedura apresenta lipídios peroxidados provavelmente provenientes de seu metabolismo normal. Quando se acrescenta

ao meio 20 mg/L de selenito de sódio, observa-se um aumento na peroxidação lipídica em relação ao controle, e com o aumento da concentração para 100 mg/L de selenito de sódio, não observamos alterações na peroxidação entre as duas concentrações avaliadas (Figura 6). Segundo Lewinska e Bartosz (2008) o mecanismo de toxicidade do selenito ocorre principalmente pela sua ação oxidativa em leveduras podendo reagir espontaneamente com a glutathione para produzir Se(0), ou podem sofrer redução pela sistema da tioredoxina produzindo, simultaneamente, intermediários e subprodutos como selenodiglutationa (GS-Se-SG), glutathionoselenol (GS-SeH), selenito de hidrogênio (HSe⁻), e ROS como superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Estes últimos, por sua vez, podem reagir com os ácidos graxos das membranas biológicas gerando produtos secundários, tal como o MDA. Nosso resultado sugere que a peroxidação de lipídios tenha ocorrido pela geração de ROS nas células em resposta a toxicidade do Se, e estas, por sua vez, reagiram com os lipídios da célula.

15

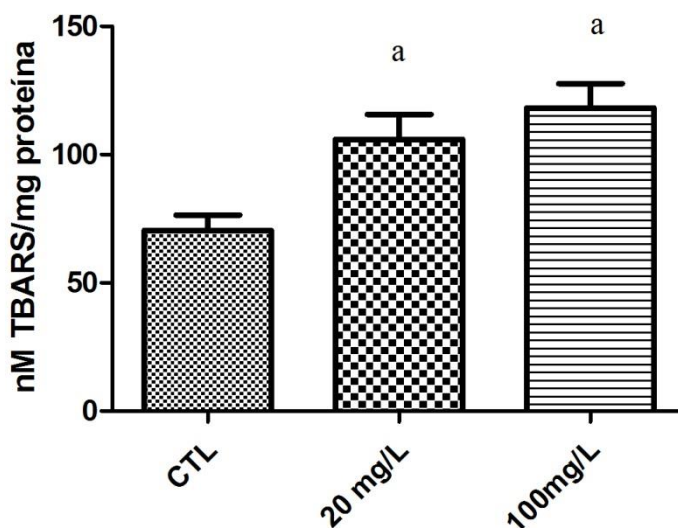


Figura 6: Determinação da peroxidação de lipídios na levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 h de crescimento em meio YPG contendo selênio, sendo (a) significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

20

5.1.5.2. Determinação dos resíduos sulfidrílicos totais

O balanço entre os pró-oxidantes e antioxidantes é crítico para a sobrevivência e funcionalidade dos organismos aeróbios. Um desequilíbrio a favor dos pró-oxidantes e/ou desfavorável aos antioxidantes, leva ao estresse oxidativo.

No contexto da ação antioxidante, a glutathiona é a molécula principal. A determinação dos resíduos sulfidrílicos livres é, essencialmente, a determinação da GSH. A diminuição dos resíduos SH livres representa uma diminuição da GSH, sendo oxidada a GSSG (Arteel & Sies, 2001). Portanto, para avaliar se ocorreu alteração na quantidade de glutathiona reduzida foi feita a determinação dos resíduos sulfidrílicos livres nas células da levedura.

Com a presença de Se no meio, observou-se que houve uma diminuição dos resíduos sulfidrílicos na célula comparando-se com a situação controle. No entanto, um aumento da concentração de Se não causa uma diminuição significativa na quantidade de resíduos livres na célula (Figura 7). Esse resultado, aliado ao aumento da peroxidação de lipídios, indica que o Se teve um papel pró-oxidante nas células de levedura, e, provavelmente, reagiu com a GSH para formar os produtos secundários já citados anteriormente. Uma diminuição da glutathiona reduzida na célula, e conseqüentemente uma diminuição da viabilidade celular, também foi observada por Izquierdo e colaboradores (2010) em células de *S. cerevisiae* incubadas com 100 mg/L de selenito de sódio e concentrações mais elevadas. Portanto, para manter a integridade da célula e uma incorporação de Se eficiente pela levedura, a concentração de Se utilizada na incubação das células para o tratamento animal foi de 20 mg/L de selenito de sódio no meio.

20

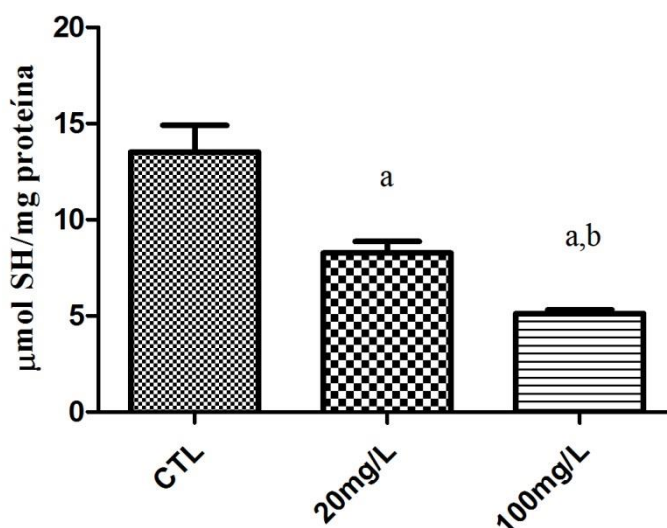


Figura 7: Determinação dos resíduos sulfidrílicos livres na levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 após 24 h de crescimento em meio YPG contendo selênio, sendo (a) significativo em relação ao controle e (b) significativo em relação a 20 mg/L ($p < 0,05$).

5.1.6. Efeito do selênio em proteínas por análise proteômica

5.1.6.1. Curva de crescimento

Foi observado que após 4 h de crescimento na presença de selenito de sódio a levedura diminui sua capacidade de crescimento, tendo sido estabilizado após 10 h de crescimento (Figura 8). O tempo de 8 h de crescimento foi o estabelecido para prosseguir com os experimentos de análise proteômica.

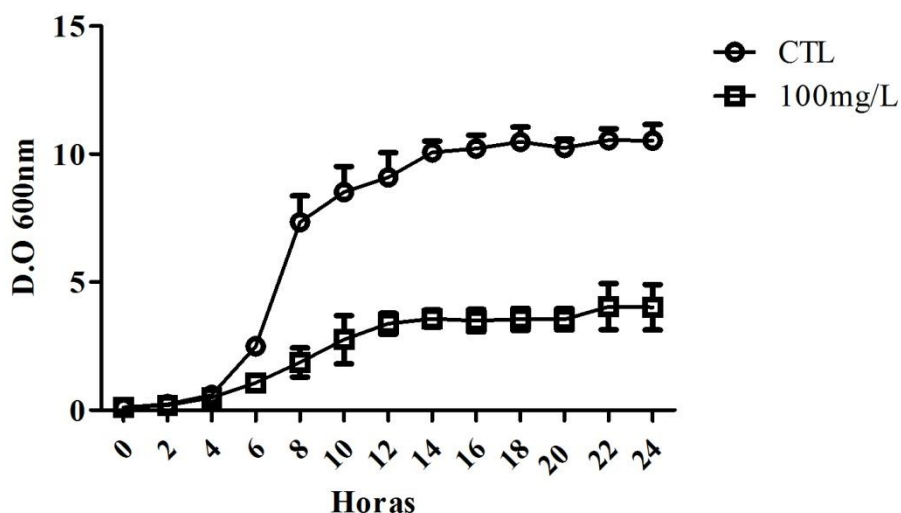


Figura 8: Curva de crescimento de células da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 na situação controle e com 100 mg/L de selenito de sódio, durante 24 h ($p < 0,05$).

5.1.6.2. Efeito do selênio na expressão de proteínas da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905

Após a análise por proteômica comparativa, foi observado diferenças na expressão de proteínas, sendo que oito proteínas foram reguladas de forma positiva e cinco foram reguladas de forma negativa (Figura 9). Após análise por espectrometria de massa, as proteínas foram identificadas (Tabela 3) e agrupadas de acordo com os grupos funcionais (Figura 10). O Se induziu um aumento no estresse oxidativo, demonstrado pela regulação positiva das três isoformas de Tiorredoxina peroxidase (Ahp1p), e também de Nitroreductase Hbn1p, Proteína de choque térmico Hsp 26 P e a Proteína responsiva a hiperosmolaridade. Indiretamente ligada a este tipo de estresse temos a Ribonucleotídeo redutase que foi regulada de forma positiva e estão envolvidas no reparo de DNA. Também foi regulada de forma positiva a proteína Cistationina

gama-liase CSE3, envolvida no metabolismo de Se. No que se referem ao metabolismo da glicose, as proteínas Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase TDH2 e TDH3, Triose-fosfato isomerase TPI1, Fosfomanomutase SEC 53 foram reguladas de forma negativa. A proteína Fator de Início de Tradução de Eucariotos 5A (eIF5A) foi regulada de forma negativa e está envolvida na

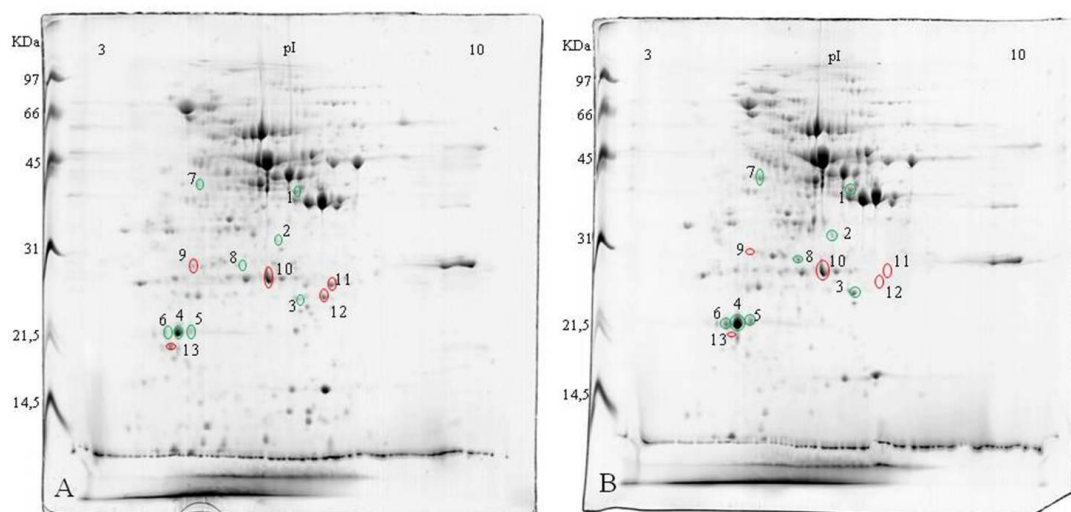


Figura 9: Mapas de expressões proteicas com pI (3-10). (A) controle. (B) Células tratadas com 100 mg/L de selenito de sódio. Proteínas marcadas em verde foram reguladas de forma positiva e, em vermelho, de forma negativa.

Tabela 3: Identificação das proteínas por espectrometria de massa.

Número do spot	Nome da proteína
1	Cistationina gama-liase CSE3
2	Proteína responsiva a hiperosmolaridade
3	Nitroreductase Hbn1p
4	Tiorredoxina peroxidase (Ahp1p)
5	Tiorredoxina peroxidase (Ahp1p)
6	Tiorredoxina peroxidase (Ahp1p)
7	Ribonucleotídeo redutase
8	Proteína de choque térmico Hsp 26 P
9	Fosfomanomutase SEC 53
10	triose-fosfato isomerase TPI1
11	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase TDH2
12	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase TDH3
13	Fator de Início de Tradução de Eucariotos 5A (eIF5A)

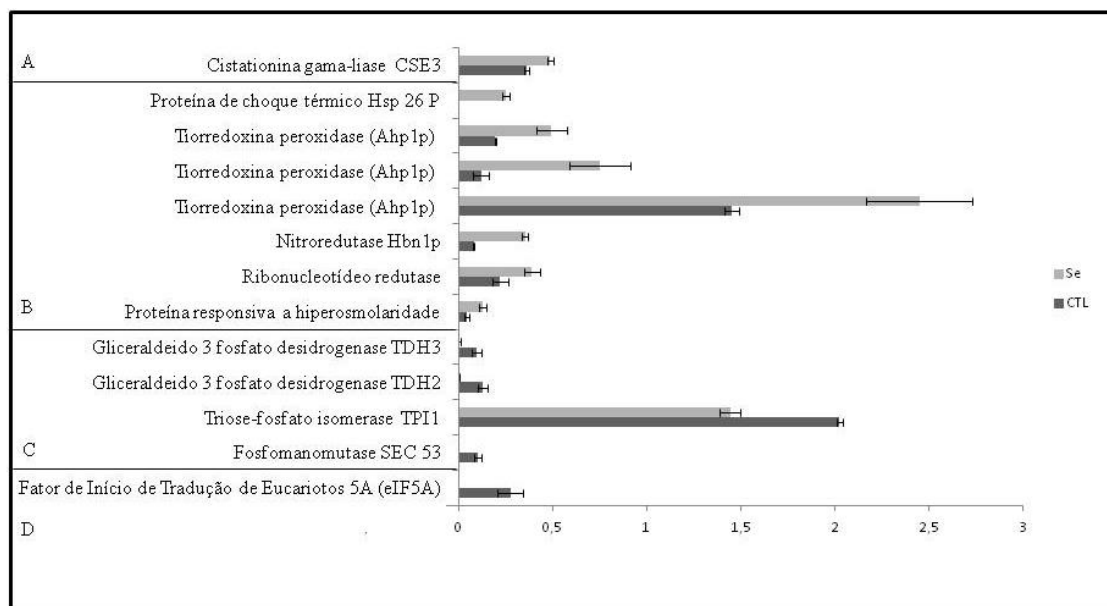


Figura 10: Proteínas identificadas e divididas por função. Para cada proteína identificada as médias dos volumes e suas variações foram normalizadas (SEM) nas duas condições experimentais mostradas. As proteínas identificadas foram divididas em 4 funcionalidades: (A) metabolismo do selênio (B) oxidativo e estresses em geral (C) Metabolismo da glicose (D) outras funções.

- Metabolismo de Se:

A expressão positiva da proteína cistationina gama-liase CSE3 demonstrou que a levedura continua a metabolizar o Se mesmo em situação de estresse. Essa proteína é a mesma que participa do metabolismo de S e converte Se-Met em metilselenol. Em leveduras o Se é assimilado pela mesma via do S com ativação do selenato por ATP sulfurilase e subsequente conversão a Se-Met (Rosen & Liu, 2009).

15

- Selenito de sódio causa estresse oxidativo em *S. cerevisiae* UFMG A-905:

A família das nitroreductases compreende um conjunto de enzimas FMN- ou FAD-dependentes, enzimas que são capazes de metabolizar compostos nitrosubstituídos usando o poder de redução do NADPH. Essas nitroreductases podem ser encontradas em bactérias e em menor quantidade em eucariotos (Oliveira *et al.*, 2010; Stopiglia *et al.*, 2013). Estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2010) demonstraram o envolvimento de Hbn1P na resposta ao estresse oxidativo quando células de levedura foram estimuladas com H₂O₂. Após

20

exposição ao H₂O₂ observou-se um aumento na peroxidação lipídica e diminuição nos níveis de GSH, e ainda um aumento na formação de ROS.

Outros estudos apontaram a proteína Ahp1 (proteína que desempenha um importante papel na redução de peróxido de hidrogénio e hidroperóxidos alquílicos) como também envolvida na resposta ao estresse oxidativo em células de leveduras expostas a cádmio, cobre, cobalto, cromo, arsenito, arsenato, mercúrio, zinco e dietil maleato (Vido *et al.*, 2001; Nguyễn-nhu & Knoop, 2002). Foi observado um aumento na peroxidação lipídica nas células de *S. cerevisiae* UFMG A-905 após incubação com selenito de sódio (Figura 6), e também uma diminuição de GSH (Figura 7) o que possivelmente foi uma consequência da geração de ROS, e que conseqüentemente ocorreu uma regulação positiva das proteínas responsivas ao estresse oxidativo. As tiorredoxinas peroxidases pertencem à família das peroxidases identificadas em procariotos e eucariotos e são capazes de reduzir peróxido de hidrogênio e alquil hidroperóxidos utilizando moléculas doadoras de elétrons que contém tiol, tais como tiorredoxina e glutathione (Nguyễn-nhu & Knoop, 2002). Sendo assim, o Se parece ligar-se a molécula de glutathione reduzida, como demonstrou Kice e colaboradores (1980), que em uma solução aquosa tamponada contendo ácido acético e dioxano, o selenito de sódio oxida tióis transformando a GSH em GS-Se-SG. Esta oxidação da glutathione parece se repetir nas células de *S. cerevisiae* UFMG A-905 causando toxicidade à levedura. Outra evidência da ação pró-oxidante do Se na célula é a expressão positiva da proteína de choque térmico Hsp 26 P, que se trata de uma proteína encontrada em eucariotos e procariotos e são induzidas em resposta ao choque térmico, que funcionam como chaperonas nos processos de desnaturação e recuperação de proteínas danificadas. Além de serem induzidas por choque térmico, outras formas de estresse causam sua indução, tais como altas concentrações de etanol e estresse oxidativo (Zuzuarregui *et al.*, 2006). Já a proteína responsiva a hiperosmolaridade é expressa em situações de estresse, principalmente se ocorre dano à parede celular e estresse osmótico (Blomberg, 2000; Fernandes *et al.*, 2004; Lisman *et al.*, 2004).

A ribonucleotídeo redutase catalisa a primeira etapa da produção de desoxirribonucleotídeos necessários para a síntese de DNA. Atua na catalisação de todos os ribonucleotídeos difosfato em desoxirribonucleotídeos difosfato desempenhando um papel central no controle dos níveis celulares de

desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs). Este último é essencial para a alta fidelidade da replicação do DNA, processos de reparo e viabilidade da mitose (Ho *et al.*, 2002). A incorporação de Se pela levedura regulou de forma positiva esta enzima demonstrando que provavelmente a célula da levedura sofreu danos ao DNA em decorrência do estresse oxidativo ocorrido, e este fato levou a célula a expressar uma maior quantidade de enzimas de reparo ao DNA.

- A incorporação de selênio inibe o metabolismo da glicose

A triose-fosfato isomerase TPI1 é uma enzima que cataliza a conversão bidirecional de gliceraldeído 3 fosfato (G3P) e fosfato de diidroxiacetona (DHAP). Somente G3P é usado na glicólise, então TPI é essencial para a produção de energia pela via glicolítica permitindo que duas moléculas de G3P sejam produzidas para cada uma das moléculas de glicose utilizada, multiplicando por duas a produção de energia. Nosso estudo mostrou que a incorporação de Se pela levedura inibiu o crescimento da levedura, que pode ser explicado pela inibição da glicólise causada pela regulação de forma negativa das enzimas gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase TDH2 e TDH3, triose-fosfato isomerase TPI1, fosfomanomutase SEC 53, que estão envolvidas na via glicolítica (El-Bayoumy *et al.*, 2012). A via glicolítica é a série de reações principal utilizada para a síntese de todas as macromoléculas importantes, como proteínas, lípidos e ácidos nucleicos (Vander Heiden *et al.*, 2009).

- Outras funções

O Fator de Início de Tradução de Eucariotos 5A (eIF5A) está presente em eucariotos, sendo em *S. cerevisiae* expressa em condições aeróbicas e é essencial para o seu crescimento em tal condição (Frigieri *et al.*, 2006). A diminuição da expressão de eIF5A também foi observada por El-Bayoumy e colaboradores (2012) em leveduras que incorporaram 1200 µg/g de Se. A incorporação de Se pela levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 inibiu seu crescimento como visto nas Figuras 8 e 5, indicando que a diminuição da viabilidade celular está relacionada à baixa síntese de proteína ocasionada pela regulação de forma negativa do eIF5A responsável pela síntese de proteínas.

5.2. Avaliação do efeito da levedura enriquecida com selênio em modelo mucosite induzida por 5-FU

5.2.1. Aspectos clínicos da evolução da mucosite

5 Mucosite é uma complicação causada pela quimioterapia e/ou radioterapia caracterizada por inflamação da mucosa gastrointestinal. Os principais danos são: perda da barreira celular epitelial da mucosa do trato gastrointestinal, inflamação e ulceração. Dentre os sintomas ocorrem náuseas, dispepsia, disfagia, vômitos e diarreia (Ducan *et al.*, 2003). Após a indução da mucosite observou-se uma perda

10 de peso significativa a partir do dia 2 em todos os grupos que receberam o 5-FU. Os tratamentos com a levedura e a levedura enriquecida com Se não diminuíram a perda de peso dos animais (Figura 11) e não promoveram melhora de apetite (Figura 12). Justino e colaboradores (2014) também observaram perda de peso significativa em camundongos com mucosite induzida por 5-FU, e somente após

15 tratamento com $1,6 \times 10^{10}$ UFC/Kg da levedura *S. boulardii* foi obtido uma diminuição na perda de peso. Provavelmente a concentração de células da levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 administrada aos animais não foi o suficiente para promover menor perda de peso (Figura 11).

20

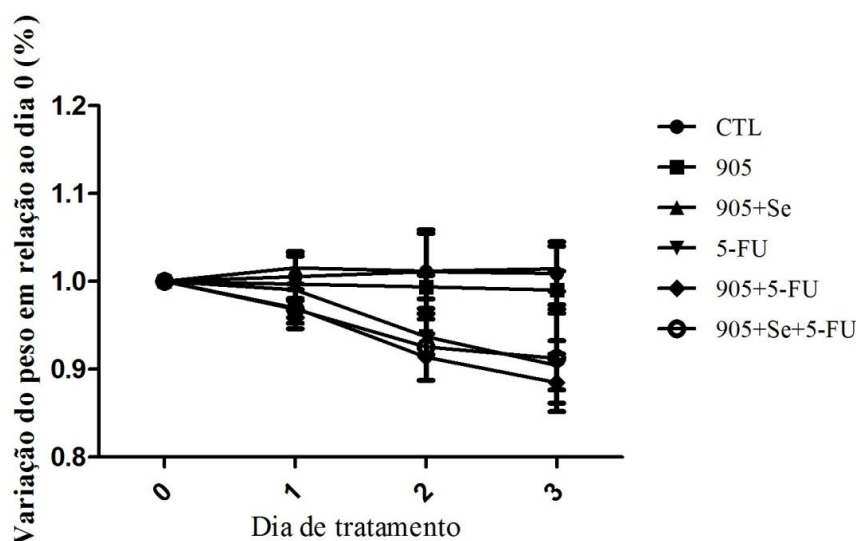


Figura 11: Perda de peso dos camundongos em relação ao peso no início do tratamento com 5-FU (dia 0 - primeiro dia de indução da mucosite). Sendo, grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) ($p < 0,05$).

25

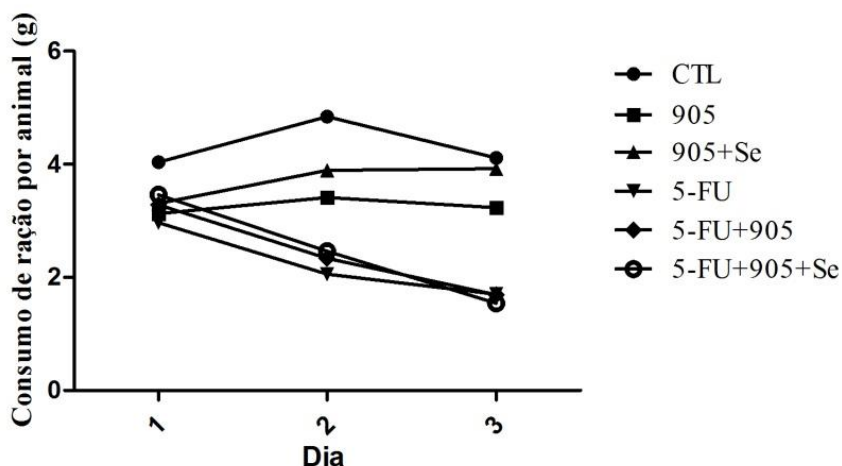


Figura 12: Variação do consumo de ração pelos camundongos. Sendo, grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) ($p < 0,05$).

5 5.2.2. Permeabilidade intestinal e níveis de sIgA no fluido intestinal

Outro aspecto importante da mucosite é a alteração na permeabilidade intestinal causada por 5-FU. O tratamento promoveu melhoras significativas. O $^{99m}\text{Tc-DTPA-CaNa}_3$ é um complexo trissódico com peso molecular de 549 Da que é capaz de ser translocado do lúmen intestinal, em locais com injúrias no epitélio.

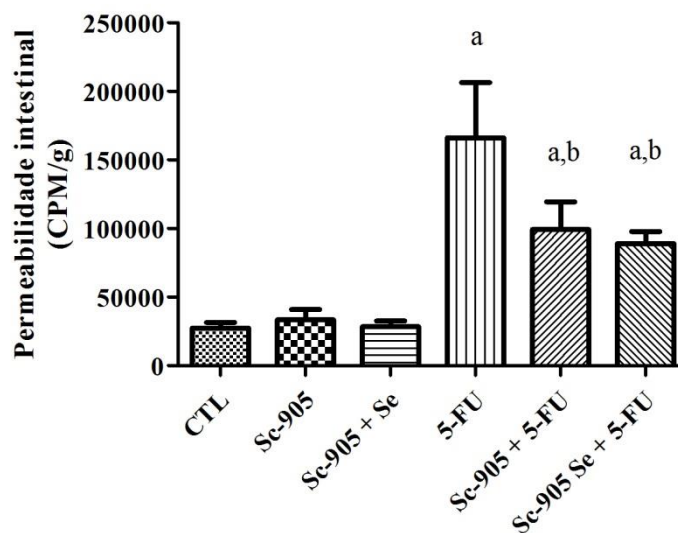
Em regiões em que a integridade epitelial é mantida, não há passagem de moléculas com peso maior que 150 Da, por isso esse método é considerado adequado para mensurar a permeabilidade do intestino. Além disso, o $^{99m}\text{Tc-DTPA-CaNa}_3$ pode ser facilmente detectável no sangue (Generoso *et al.*, 2010; Generoso *et al.*, 2011). A avaliação da permeabilidade intestinal foi obtida pela

quantificação da radiação emitida pelo $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ translocado do intestino para o sangue. Os animais desafiados com 5-FU tiveram sua permeabilidade intestinal aumentada significativamente quando comparados aos animais dos grupos

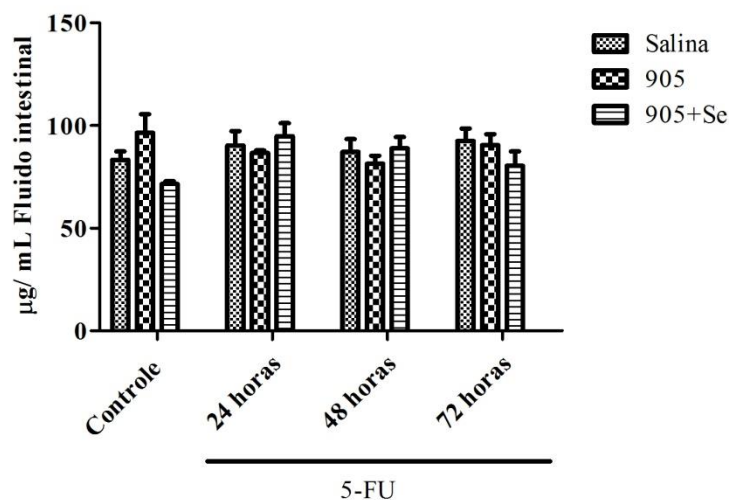
controles. Contudo, os tratamentos com a levedura e a levedura enriquecida com Se evitaram o aumento da permeabilidade intestinal, mas não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Figura 13). Generoso e colaboradores (2010) observaram que o tratamento com *S. cerevisiae* UFMG A-905, viável e inativada, promoveu uma diminuição da translocação de $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ em animais com obstrução intestinal e o mesmo foi observado posteriormente com a levedura *S. boulardii* (Generoso *et al.*, 2011). Justino e colaboradores (2014) observaram que a levedura *S. boulardii* diminui os efeitos do 5-FU na permeabilidade intestinal

de camundongos da linhagem *Swiss*. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que essa levedura também diminui a permeabilidade intestinal em camundongos da linhagem *BalbC* com colite induzida por DSS (Tiago *et al.*, 2015), portanto, possivelmente o Se não influencia na permeabilidade intestinal.

- 5 Quanto aos níveis de sIgA no fluido não foi observado diferença entre os grupos tratados (Figura 14).



- 10 **Figura 13:** Avaliação da permeabilidade intestinal nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e (b) significativo em relação ao 5-FU ($p < 0,05$).



- 15 **Figura 14:** Avaliação da produção de sIgA. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.2.3. Aspectos histopatológicos

Quanto à histologia, foram observados aspectos histológicos normais na mucosa dos camundongos do grupo controle, sejam aqueles tratados com salina, com a levedura e com a levedura enriquecida com selênio (Figura 15 a, c, e) (score 0). Vilosidades rombadas e encurtadas, infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e camada muscular e necrose de cripta foram observadas no grupo de mucosite (Figura 15 b). Os camundongos com mucosite induzida e tratados com a levedura (Figura 15 d) ou com a levedura enriquecida com selênio (Figura 15 f) demonstraram preservação parcial das vilosidades e criptas (score 3).

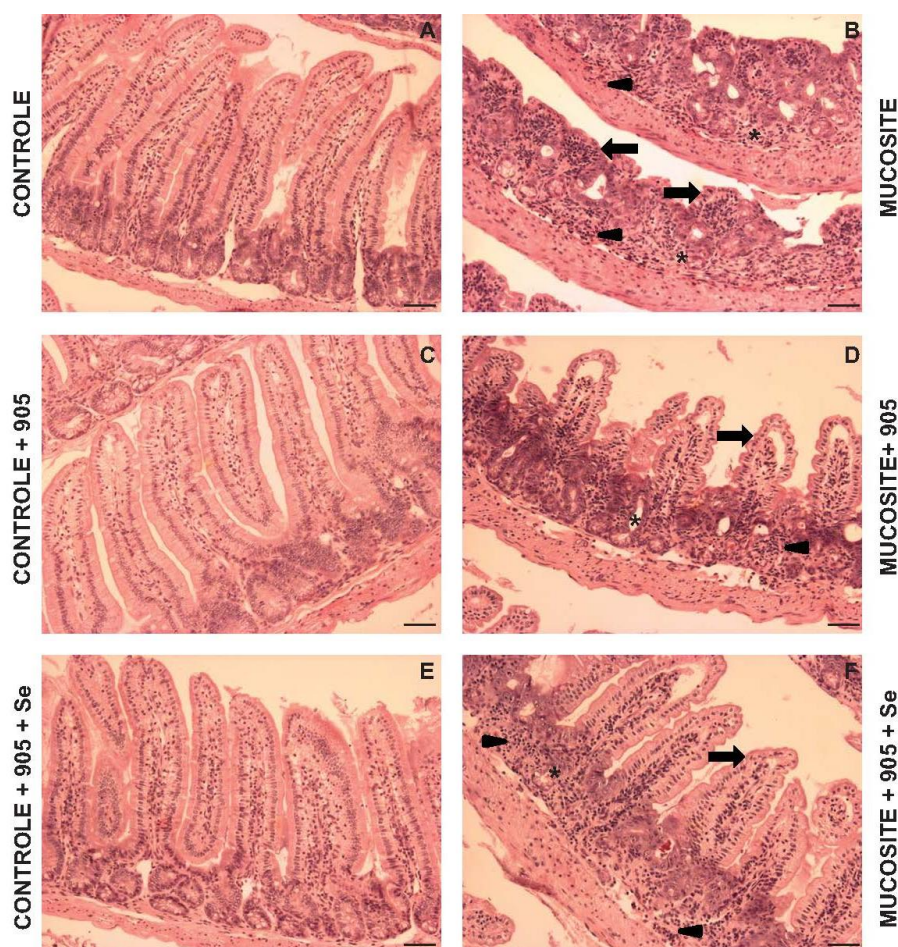


Figura 15: Análise histológica do jejuno: Os grupos controles estão representados pelas letras A, C e E (CTL, 905, 905+Se, respectivamente) e os animais com mucosite induzida e os tratamentos com a levedura estão representados pelas letras B, D e F (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU, respectivamente). Vilosidades encurtadas (setas), infiltração de células inflamatórias na lâmina própria e camada muscular (cabeças de seta) e necrose de cripta (asterisco) estão presentes nos grupos mucosite (B). Preservação parcial das vilosidades (setas) e criptas (asteriscos) e infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (pontas de setas) são observadas nos grupos 905+5-FU, 905+Se+5FU. Barra = 50 μ M, coloração HE.

Observou-se a presença de infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, porém não houve comprometimento das camadas musculares (escore 2). A análise estatística dos escores histológicos evidenciou diferença entre os grupos (Figura 16).

5

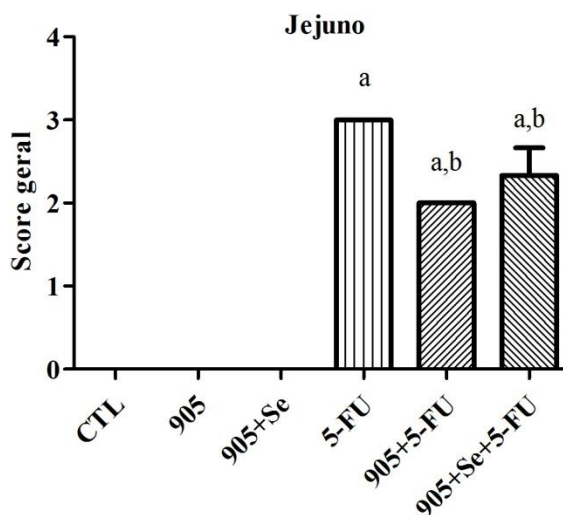


Figura 16: Score histológico geral dos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e (b) significativo em relação ao 5-FU ($p < 0,05$).

10

O encurtamento das vilosidades não apresentou melhora significativa nos grupos que tinham mucosite e receberam os tratamentos, em relação ao grupo somente com mucosite (Figura 17). No entanto, houve melhora visível quanto à preservação do epitélio intestinal (jejuno). Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 foi capaz de preservar o epitélio tecidual do cólon de animais com colite induzida por DSS (Tiago *et al.* 2015). Com esses resultados, podemos reafirmar a capacidade dessa levedura em preservar tecidos em processo de inflamação. A destruição da mucosa intestinal está associada a processos inflamatórios causados pela infiltração de células inflamatórias (Duncan & Grant, 2005). Para confirmar a ação benéfica da levedura em processos inflamatórios, foi feita a avaliação do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para o sítio primário de inflamação. Os resultados obtidos serão descritos e discutidos a seguir.

25

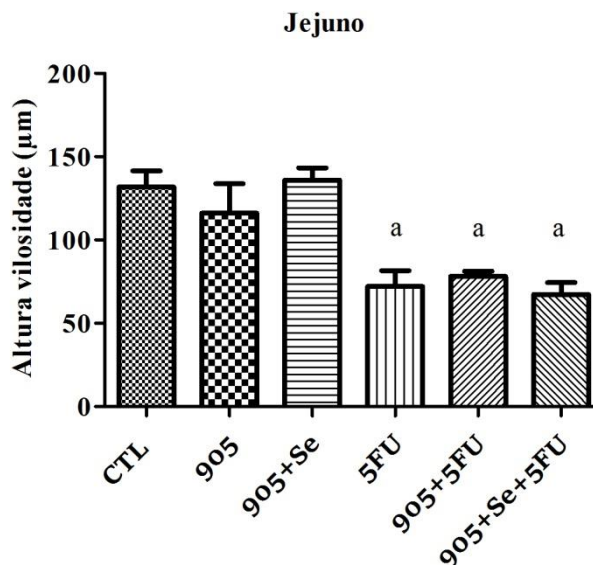


Figura 17: Altura das vilosidades do jejuno. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls. Sendo (a) significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

5 5.2.4. Avaliação do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para o sítio primário de inflamação

Após a indução da mucosite foi observado um aumento no recrutamento de neutrófilos (figura 18) e eosinófilos (figura 19) no jejuno dos grupos com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se). No entanto, os animais com mucosite induzida que receberam o tratamento com a levedura enriquecida com Se tiveram uma diminuição do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos em relação ao grupo 5-FU e 905+5-FU. Resultados semelhantes em tratamentos de mucosite induzida por 5-FU foram observados por Justino e colaboradores (2015) utilizando *S. boulardii* e, por Maeda e colaboradores (2010), ao tratar animais com N-acetilcisteína (NAC), uma substância antioxidante, para melhorar danos intestinais causados por MTX, um fármaco anti-tumoral. Ferreira e colaboradores (2012) também observaram que o fármaco 5-FU aumentou o recrutamento de eosinófilos no intestino delgado. Vários estudos demonstraram que mudanças histopatológicas ocorridas na mucosite causada por 5-FU ocorrem devido à infiltração de neutrófilos e eosinófilos na mucosa provocando uma reação inflamatória (Justino *et al.*, 2014; Pedroso *et al.*, 2015).

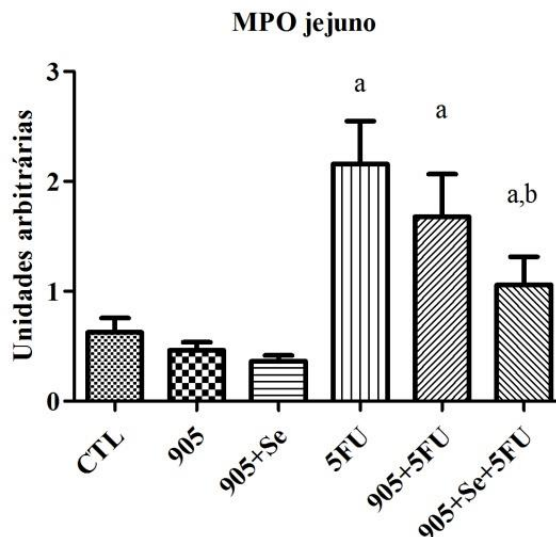


Figura 18: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, no jejuno, por meio da atividade de sua enzima MPO, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) após 72 horas, sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e (b) significativo em relação ao 5-FU. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).

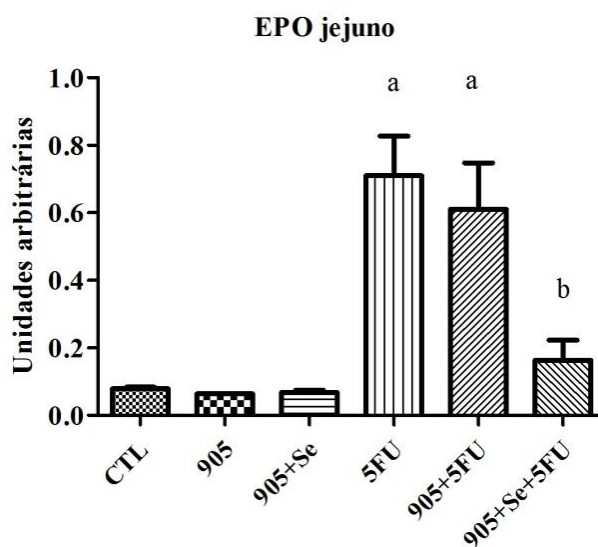
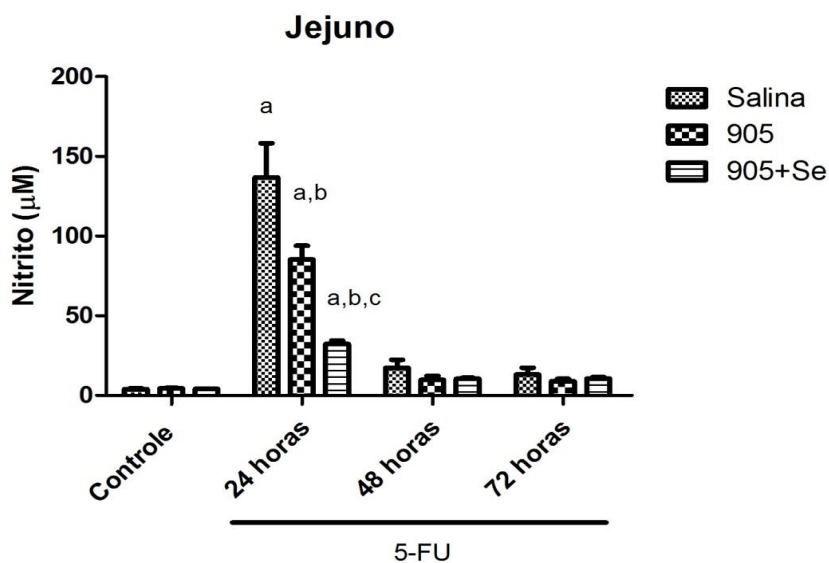


Figura 19: Avaliação qualitativa da presença de eosinófilos, no jejuno, por meio da atividade de sua enzima EPO, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) após 72 horas, sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e (b) significativo em relação ao 5-FU ($p < 0,05$). Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).

5.2.5. Avaliação dos parâmetros oxidativos e quimiocina CXCL1/KC e da interleucina IL-1 β

Em mucosite a formação de ROS é o primeiro passo para ocorrer uma inflamação. Ao causarem danos como, por exemplo, quebra do DNA e peroxidação de lipídios, inicia-se uma série de eventos como a ativação de vias de transdução que ativam fatores de transcrição tais como p53 e NF- κ B que ativam citocinas inflamatórias como, por exemplo, TNF- α e IL-1 β (Sonis, 2004). Após a indução da mucosite, foi observado um aumento na produção de NO após 24 h da indução da doença (figura 20). No entanto, os animais com mucosite induzida que receberam o tratamento com a levedura, tiveram uma diminuição desses parâmetros em relação ao grupo 5-FU. Quando tratamos com a levedura enriquecida com Se a diminuição desses parâmetros em relação ao grupo 5-FU foi ainda maior que o tratamento utilizando somente a levedura.



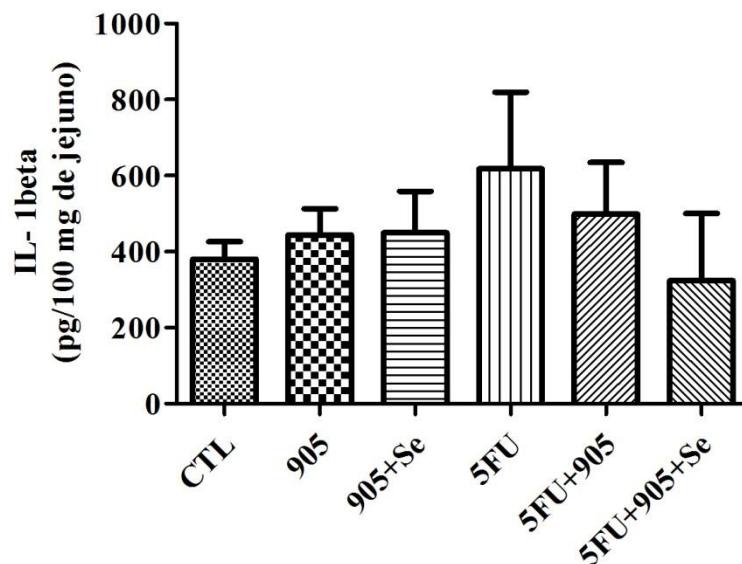
15

Figura 20: Concentração de nitrito após a exposição a 5-FU, nos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se), (b) significativo em relação ao 5-FU, e (c) significativo em relação ao 905+5-FU. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).

20

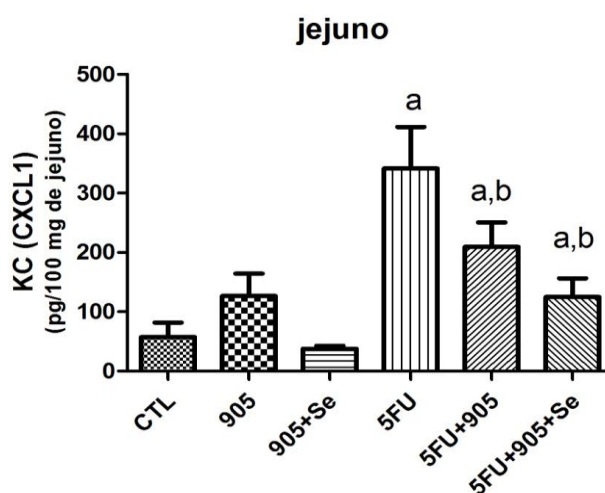
Animais com mucosite induzida apresentaram um aumento de IL-1 β , entretanto nenhum tratamento foi capaz de diminuir sua concentração (Figura 21). O tratamento com a 905 diminui a concentração da quimiocina pro-inflamatória

CXCL1/KC em relação ao grupo 5-FU e o tratamento com a levedura enriquecida com selênio promove uma diminuição ainda maior da concentração dessa quimiocina (figura 22).



5

Figura 21: Quantificação de IL-1 β no jejuno. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls.



10

Figura 22: Concentração da quimiocina CXCL1/KC no jejuno dos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) após 72 horas, sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e (b) significativo em relação ao 5-FU. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).

15

A CXCL1/KC está relacionada à sinalização para recrutamento de neutrófilos (Deruaz *et al.*, 2008) e o aumento da atividade de CXCL1/KC está relacionada também com um aumento primário de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) que contribui na resposta inflamatória do intestino ativando cascatas de mediadores e expressões de citocinas e quimiocinas recrutadoras de neutrófilos (Ammendrup *et al.*, 2000; Hierholzer *et al.*, 2004). Ao observamos nossos resultados vemos que a indução de mucosite leva não só a um aumento nos níveis de KC, como também nos níveis de NO, e ambos diminuem nos animais tratados com levedura e ainda mais nos tratados com a levedura enriquecida com Se. É importante ressaltar que o aumento de NO ocorre nas primeiras 24 horas de indução da mucosite e os efeitos dos tratamentos são observados também nesse momento. Já a diminuição dos níveis de KC e MPO são observados posteriormente à diminuição dos níveis de NO (72 horas depois). Já é conhecido que espécies reativas são as primeiras vias de sinalização da mucosite (Sonis, 2004), portanto uma menor expressão de NO pode ter resultado em uma menor expressão de KC, e, conseqüentemente, ocorreu um menor recrutamento de neutrófilos. Resultados semelhantes foram observados por Justino e colaboradores (2014), onde o tratamento com *S. boulardii* diminuiu a concentração de NO no jejuno de animais com mucosite induzida por 5-FU.

Ao analisarmos a peroxidação lipídica observamos que houve um aumento após 48 h no jejuno dos grupos tratados (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU) em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) (figura 23). Esse resultado também contribui para verificar os efeitos do tratamento com a levedura enriquecida com Se na diminuição da ação de espécies reativas. A eficácia do tratamento de inflamações com antioxidante já vem sendo observado em diversos trabalhos visto que ROS são reconhecidas como fatores importantes em várias doenças, por exemplo, doenças inflamatórias intestinais, tais como colite e câncer colorretal (Canali *et al.*, 2000; Miyazono *et al.*, 2011). Um aumento em TBARS após 48 h foi observado por Maeda e colaboradores (2010) em ratos desafiados com MTX, e tratados com NAC. Além disso, já é descrito na literatura que o radical NO_2^{\cdot} resultante da reação do NO com o O_2 já é descrito como um importante desencadeador de peroxidação lipídica (Davis *et al.*, 2001). Sendo assim, uma diminuição da peroxidação lipídica pode também estar relacionada com a diminuição de NO 24 h após a indução da mucosite. Os danos causados

às células de barreira da membrana lipídica durante a peroxidação de lipídios resulta em uma regulação positiva de genes de resposta imediata tais como aqueles que codificam c-JUN e c-JUN amino terminal kinase, pertence ao grupo das MAPK e é ativado por exposição das células a citocinas, participando de vias de sinalização para as respostas inflamatórias (Ammendrup *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2004; Bogoyevitch *et al.*, 2009).

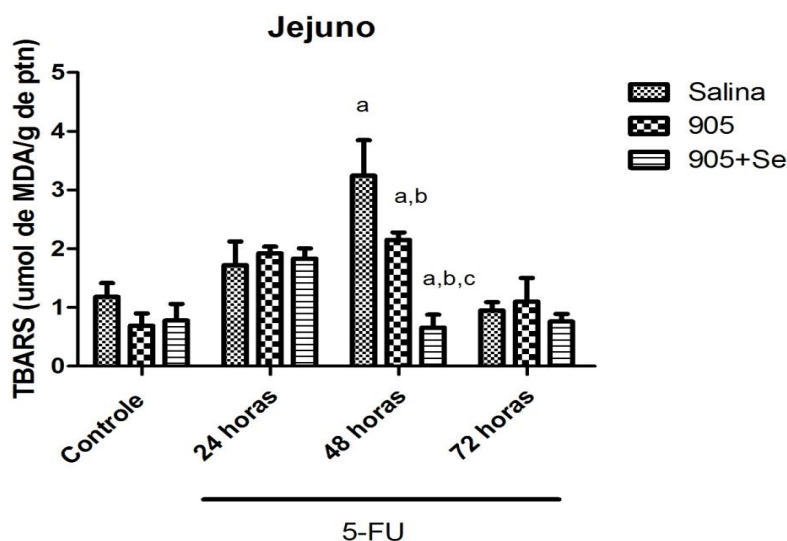


Figura 23: Produção de TBARS no jejuno dos animais dos grupos controle (CTL, 905, 905+Se) e dos animais com mucosite induzida (5-FU, 905+5-FU, 905+Se+5FU), sendo (a) significativo em relação aos grupos controle (CTL, 905, 905+Se), (b) significativo em relação ao 5-FU, e (c) significativo em relação ao 905+5-FU. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6. Conclusões

A primeira etapa desse trabalho foi avaliar se a levedura *S. cerevisiae* UFMG A-905 é capaz de incorporar Se, e se essa incorporação causava danos à célula, e o tipo de dano. Concluímos que esta levedura apresenta boa capacidade de incorporar Se em várias concentrações e essa incorporação é maior à medida que a concentração de Se no meio é aumentada. Quando avaliamos o efeito celular de Se incorporado pela levedura (aproximadamente 1800 µg/g de peso seco, após incorporação com 100 mg/L de Se) observamos que o metal causa danos aos lipídios celulares, ativa defesas antioxidantes, inibe o crescimento celular e altera a expressão de proteínas. Em relação às mudanças protéicas por meio da análise proteômica, observamos que o Se altera a expressão de 13 proteínas.

Ao avaliarmos se a levedura enriquecida ou não com selênio altera a inflamação causada por 5-FU concluímos que a levedura confere proteção e esse efeito protetor do *S. cerevisiae* UFMG A-905 pode envolver diferentes vias. Estas vias incluem mecanismos tais como a manutenção da integridade da mucosa intestinal que foi conferido pela levedura independentemente de estar ou não enriquecida com selênio. Quando enriquecida com selênio teve ação antioxidante protegendo contra a formação de espécies reativas de oxigênio, um dos efeitos nocivos da quimioterapia, o que levou a uma redução da inflamação.

8. Referências Bibliográficas

- Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**: 15(3), 341-352 2009.
- 5 Ammendrup A, Maillard A, Nielsen K, Andersen NA, Serup P, Madsen OD, Mandrup-Poulsen T, Bonny C. The c-Jun Amino-Terminal Kinase Pathway Is Preferentially Activated by Interleukin-1 and Controls Apoptosis in Differentiating Pancreatic β -Cells. **Diabetes**: 49, 1468–1476, 2000
- 10 Andoh A, Hirashima M, Maeda H, Hata K, Inatomi O, Tsujikawa T, Sasaki M, Takahashi K, Fujiyama Y. Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease. **Nutrition**: 21, 574-579, 2005.
- Arantes RME, Marche HHF, Bahia MT, Cunha FQ, Rossi MA, Silva JS. Interferon- γ -Induced Nitric Oxide Causes Intrinsic Intestinal Denervation in *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice. **American Journal of Pathology**: 164(4), 2004.
- 15 Arteel GE, Sies H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**: 10, 153-158, 2001.
- Banerjee D, Kumar AP, Kumar B, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. **Current Science**: 20 83, 1193-1194, 2002.
- Behne D, Alber D, Kyriakopoulos A. Effects of long-term selenium yeast supplementation on selenium status studied in the rat. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**: 23, 258-264, 2009.
- Blomberg A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. **FEMS Microbiology Letters**: 25 182, 1-8, 2000.
- Bogoyevitch MA, Ngoei KR, Zhao TT, Yeap YY, Ng DC. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges. **Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. 1804 (3), 463–475, 2010.
- 30 Bowen JM, Gibson J, Cummis AG. Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**: 59(3), 337-348, 2007.
- Bowen JM, Gibson RJ, Keefe DMK. Animal models of mucositis: implications for therapy. **Journal of Supportive Oncology**: 9, 161-168, 2011.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**: 72, 248-54, 1976.
- 35 Brozmanová J, Mániková D, Vlcková V, Chovanec M. Selenium: a double-edged sword for defense and offence in cancer. **Archives of Toxicology**: 84, 919-938, 2010.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**: 52, 302-310, 1978.

- Canali R, Vignolini F., Nobili F., Mengheri E. Reduction of oxidative stress and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) expression by red wine polyphenols in zinc deficiency induced intestinal damage of rat. **Free Radical Biology & Medicine**. 28, 1661-70, 2000.
- 5 Chen, S.M, Swilley S., Bell R. Lead induced alterations in nitrite and nitrate levels in different regions of the rat brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**. 125, 315-323, 2000.
- Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. **Free Radical Biology & Medicine**: 36, 1481-1495, 2004.
- 10 Clark LC, Combs GF, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin - a randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**: 276, 57-63, 1996.
- Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**: 41, 203-36, 2001.
- 15 Deruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC, Ferreira BR, Graham GJ, Shaw JP, Wells TN, Teixeira MM, Power CA, Proudfoot AE: Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with anti-inflammatory activity. **The Journal of Experimental Medicine**: 205, 2019 -2031, 2008
- 20 Devipriya N, Sudheer AR, Srinivasan M, Menon VP. Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**: 654, 1-7, 2008.
- Duncan M., Grant G.Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments.**Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 18(9),853-874, 2003.
- 25 El-Bayoumy K, Das A, Russell S, Wolfe S, Jordan R, Renganathan K, Loughran TP, Somiari. The effect of selenium enrichment on baker's yeast proteome. **Journal of Proteomics**: 75(3:4), 1018-1030, 2012.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**: 82, 70-77, 1959.
- 30 FAO/WHO Report. **Food and Agricultural Organization/World Health Organization Working Group**. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002.
- Fernandes PMB, Domitrovic T, Kao CM, Kurtenbach E. Genomic expression pattern in *Saccharomyces cerevisiae* cells in response to high hydrostatic pressure. **FEBS Letters**: 35 556, 153-160, 2004.
- Ferreira TM, Leonel AJ, Melo MA, Santos RRG, Cara DC, Cardoso VN, Correia MITD, Alvarez-Leite JI. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids**: 47, 669-678, 2012.

- Folignè B, Dewulf J, Vandekerckove P. Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. **World Journal of Gastroenterology**: 16(17), 2134-2145, 2010.
- 5 Foster LH, Sumar S. Selenium in the environment, food and health. **Nutrition & Food Science**:5, 17-23, 1995.
- Frigieri MC, Cano VSP, Apponi LH, Dias CAO, Gregio APB, Silveira WS, Zanelli CF, Valentini SR. eIF5A: Uma proteína essencial para a viabilidade celular cuja função permanece obscura. **Revista de Ciência. Farmacêutica Básica Aplicada**: 27(3), 189-195, 2006.
- 10 Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**: 7, 503-514, 2010.
- Generoso SV, Viana M, Santos R, Martins FS, Machado JAN, Arantes RME, Nicoli JR, Correia MITD, Cardoso VN. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. **Archives of Microbiology**: 484, 192-477, 2010.
- 15 Generoso SV, Viana ML, Santos RG, Arantes RM, Martins FS, Nicoli JR, Machado JA, Correia MI, Cardoso VN. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**: 50(4): 261-269, 2011.
- 20 Guarner, F.; Khan, A.G.; Garisch, J.; et al. Probióticos e Prebióticos. Organização mundial de Gastroenterologia: Guias Práticas. 2008.
- Halliwell B. **Free radicals in biology and medicine** / Halliwell B, Gutteridge JMC. 4th ed. - Oxford: Oxford University Press, 851 p.: ill., ISBN 9780198568698, 2007.
- Hewitson JP, Harcus YM, Curwen RS, Dowle AA. The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products. **Molecular and**
- 25 **Biochemical Parasitology**: 160, 8-21, 2008.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, Vo M, Taggart J, Goudreault M, Muskat B, Alfarano C, Dewar D, Lin Z, Michalickova K, Willems AR, Sassi H, Nielsen PA, Rasmussen KJ, Andersen JR, Johansen LE, Hansen LH, Jespersen H,
- 30 Podtelejnikov A, Nielsen E, Crawford J, Poulsen V, Sørensen BD, Matthiesen J, Hendrickson RC, Gleeson F, Pawson T, Moran MF, Durocher D, Mann M, Hogue CWV, Figeys D, Tyer M. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**: 415(6868): 180-183, 2002.
- Hrdina J, Banning A, Kipp A, Loh G, Blaut M, Brigelius-Flohé R. The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. **Journal of Nutritional**
- 35 **Biochemistry**: 20, 638-648, 2009.
- Izquierdo A, Casas C, Herrero E. Selenite-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*: protective role of glutaredoxins. **Microbiology**: 156, 2608-2620, 2010.
- 40 Justino PFC, Melo LFM, Nogueira AF, Costa JVG, Silva LMN, Santos CM, Mendes WO, Costa MR, Franco AX, Lima AA, Ribeiro RA, Souza MHLP, Soares PMG. 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:** 111, 1611-1621, 2014.
- 5 Kaur T, Bansal MP. Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. **Nutrición Hospitalar:** 21: 699-703, 2006.
- Kice JL, Lee TWS, Pan S. Mechanism of the reaction of thiols with selenite. **Journal of the American Chemical Society:** 102, 4448-4455, 1980.
- 10 Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine:** 8, 223-246, 2003.
- Kieliszek M, Błażej S, Bzducha-Wróbel A, Kurcz A. Effects of Selenium on Morphological Changes in *Candida utilis* ATCC 9950 Yeast Cells. **Biological Trace Element Research.** 169, 387–393, 2015.
- 15 Kunavue N, Lien TF. Effects of fulvic acid and probiotic on growth performance, nutrient digestibility, blood parameters and immunity of pigs. **Journal of Animal Science Advances:** 2(8), 711-721, 2012.
- Lamberti C, Mangiapane E, Pessione A, Mazzoli R, Giunta C, Pessione E. Proteomic characterization of a selenium-metabolizing probiotic *Lactobacillus reuteri* Lb2 BM for nutraceutical applications. **Proteomics:** 11, 1-10, 2011.
- 20 Lewinska A, Bartosz G. A role for yeast glutaredoxin genes in selenite-mediated oxidative stress. **Fungal Genetics and Biology:** 45, 1182-1187, 2008.
- Li C, Zhou HM. The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense. **Enzyme Research:** 1-6, 2011.
- 25 Li Q, Harvey LM, McNeil B. Oxidative stress in industrial fungi. **Critical Reviews in Biotechnology:** 29(3): 199-213, 2009.
- Lisman Q, Urli-Stam D, Holthuis JCM. HOR7, a multicopy suppressor of the Ca²⁺-induced growth defect in sphingolipid mannosyltransferase-deficient yeast. **The Journal of Biological Chemistry:** 279(35), 36390-36396, 2004.
- 30 Logan RM, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Sonis ST, Keefe DM. Characterization of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology:** 62(1), 33-41, 2008.
- Longley DB, Harkin DP, Johnstone PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer:** 3, 330-338, 2003.
- 35 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin reagent. **The Journal of Biological Chemistry:** 193, 265-275, 1951.
- Lushchak VI, Gospodaryov DV. Catalase protects cellular proteins from oxidative modifications in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Biology International:** 29, 187-192, 2005.

- Ly NP, Litonjua A, Gold DR, Celedón JC. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? **Clinical reviews in allergy and immunology**: 5, 1087-94, 2001.
- 5 Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S, Horie T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. **Cancer Chemother Pharmacol**: 65, 1117–1123, 2010.
- Martins FS, Elian SDA, Vieira AT, Tiago FCP, Martins AKS, Silva FCP, Souza ELS, Sousa LP, Araújo HRC, Pimenta PF, Bonjardim CA, Arantes RME, Teixeira MM, Nicoli JR. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**: 301, 359-364 10 2011.
- Martins FS, Nardi RMD, Arantes RME, Rosa CA, Neves MJ, Nicoli JR. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **The Journal of General and Applied Microbiology**: 15 51, 83-92, 2005.
- Martins FS, Rodrigues ACP, Tiago FCP, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RME, Nardi RMD, Neves MJ, Nicoli JR. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**: 56, 352-359, 2007.
- Martins FS, Vieira AT, Elian SD, Arantes RME, Tiago FCP, Sousa LP, Araújo HRC, Pimenta PF, Bonjardim CA, Nicoli JR, Teixeira MM. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**: 15(4), 270-279, 2013.
- 25 Menezes MABC, Jacimovic R. Optimised k0-instrumental neutron activation method using the TRIGA MARK I IPR-R1 reactor at CDTN/CNEN. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research**: 564, 707-715, 2006.
- Miyazono Y, Gao F, Hone T. Oxidative Stress Contributes to Methotrexate induced Small Intestinal Toxicity in Rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**: 39, 1119-1127, 2004.
- 30 Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**: 9, 255-262, 1988.
- Nguyên-nhu NT, Knoop B. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. **Toxicology Letters**: 135, 219-228, 35 2002.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**: 220(2), 403-409, 1994.

- Oliveira IM, Zanotto-Filho A, Moreira JCF, Bonatto D, Henriques JAP. The role of two putative nitroreductases, Frm2p and Hbn1p, in the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**: 27, 89-102, 2010.
- Papp L, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants and redox signaling**: 9(7), 775-806, 2007.
- 5 Ponce de León CA, Bayón MM, Paquin C, Caruso JA. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. **Journal of Applied Microbiology**: 92, 602-610, 2002.
- Pedroso, S.H., Vieira, A.T., Bastos, R.W., Oliveira, J.S., Cartelle, C.T., Arantes, R.E., Soares, P.G., Generoso, S.V., Cardoso, V.N., Teixeira, M.M., Nicoli, J.R., Martins, F.S. **Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice**. *Microbiology* 161:1950-1960, 2015.
- 10 Rayman MP. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? **British Journal of Nutrition**: 92, 557-573, 2004.
- 15 Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**: 22(3), 659-661, 2008.
- Rosen BP, Liu Z. Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. **Environment International**: 35, 512-515, 2009.
- Scandalios JG. Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. **Free Radical Biology & Medicine**: 23(3), 471-472, 1997.
- 20 Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. **Cellular and Molecular Life Sciences**: 61, 1988-1995, 2004.
- Schrauzer GN. Selenium yeast: Composition, quality, analysis, and safety. **Pure and Applied Chemistry**: 78, 105-109, 2006.
- 25 Sonis ST. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**: 4(4), 277-284, 2004.
- Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, Poole SP, Teixeira MM. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**: 131(8), 1800-1808, 2000.
- 30 Stopiglia CDO, Carissimi M, Daboit TC, Stefani V, Corbellini VA, Scroferneker ML. Application of 6-nitrocoumarin as a substrate for the fluorescent detection of nitroreductase activity in *Sporothrix schenckii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**: 55(5), 353-356, 2013.
- Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**: 83(2), 209-215, 1985.
- 35 Suhajda A, Hegóczki J, Janzso B, Pais I, Vereczkey. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**: 14, 43-47, 2000.

- Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gbison RJ. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy Research and Practice**: 2012, 1-11, 2012.
- 5 Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**: 57, 134-144, 2003.
- Tiago FC, Martins FS, Souza EL, Pimenta PF, Araujo HR, Castro IM, Brandão RL, Nicoli JR. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. **Journal of Medical Microbiology**: 61(9), 1194-1207, 2012.
- 10 Tiago FC, Porto BA, Ribeiro NS, Moreira LM, Arantes RM, Vieira AT, Teixeira MM, Generoso SV, Nascimento VN, Martins FS, Nicoli JR. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG A-905 in experimental model of inflammatory bowel disease. **Beneficial Microbes**: 6(6), 807-15, 2015
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**: 324(22), 1029-1033, 2009.
- 15 Viana ML, Santos RG, Generoso SV, Arantes RM, Correia MI, Cardoso VN. Pretreatment with arginine preserves intestinal barrier integrity and reduces bacterial translocation in mice. **Nutrition**: 26(2), 218-233, 2010.
- Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano MB, Labarre J. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**: 276(11), 8469-8474, 2001.
- 20 Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. **Frontiers in Immunology**: 4, 445, 2013.
- Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**: 2, 541-546, 2007.
- 25 Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J. Antioxidant defense systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium. **Biochimica et Biophysica Acta**: 1797, 890-896, 2010.
- Wong GKT, Marsden PA. Nitric oxide synthases: regulation in disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**. 11, 215-20, 1996.
- 30 Xia SK, Chen L, Liang JQ. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**: 55, 2413-2417, 2007.
- Zhang L, Li D, Gao P. Expulsion of selenium/protein nanoparticles through vesicle-like structures by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic environment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 12, 3381-6, 2012.
- 35 Zuzuarregui A, Monteoliva L, Gil C, Olmo M. Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**: 72(1), 836-847, 2006.

ANEXO I

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 186 / 2012, relativo ao projeto Intitulado "Estudo das alterações Intestinais associadas ao uso de quimioterápicos e a terapêutica da ação de probióticos em experimentação animal", que tem como responsável Flaviano dos Santos Martins, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/07/2012. Este certificado espira-se em 10/07/2017.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 186 / 2012, related to the Project entitled "Study of Intestinal disorders associated with the use of chemotherapy and the therapeutic action of probiotics in animal experiments", under the supervision of Flaviano dos Santos Martins, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/07/2012. This certificate expires in 10/07/2017.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 10/07/2012.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/ceua/ceua/ Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br</p>	

ANEXO II