

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Zélia Menezes Garcia

**“PAPEL DA MICROBIOTA NO DESENVOLVIMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU)”**

Belo Horizonte

Fevereiro, 2015

Zélia Menezes Garcia

**“PAPEL DA MICROBIOTA NO DESENVOLVIMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU)”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza
(depto de microbiologia, ICB/UFMG)

Co-orientador: Caio Tavares Fagundes
(depto de microbiologia, ICB/UFMG)

Co-orientador: Mauro Martins Teixeira
(depto de bioquímica e imunologia, ICB/UFMG)

UFMG

Belo Horizonte

Fevereiro, 2015

043

Garcia, Zélia Menezes.

Papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) [manuscrito] / Zélia Menezes Garcia. – 2015.

110 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza. Coorientadores: Caio Tavares Fagundes e Mauro Martins Teixeira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Mucosite. 3. Trato Gastrointestinal. 4. Microbiota. 5. Fluorouracil. 6. Intestino Delgado. I. Souza, Danielle da Glória de. II. Fagundes, Caio Tavares. III. Teixeira, Mauro Martins. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientador: Prof. Mauro Martins Teixeira; Prof. Caio Tavares Fagundes
Relatora e Suplente: Dra. Raquel Gouvêa dos Santos
Suplente externo: Dra. Luana Dourado

Ata
OK!

Às 14:00 horas do dia 27 de fevereiro de 2015, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelo Prof. Flávio Almeida Amaral (Depto de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG), pelo Dr. Valbert Nascimento Cardoso (Departamento de Análise Clínicas/Faculdade de Farmácia/UFMG), pelo Dr. Luis Carlos Crocco Afonso (Departamento de Ciências Biológicas-ICBE/UFPO), pela Dra. Regina Pekelmann Markus (Departamento de Fisiologia-ICB/USP) e a Profa. Daniele da Glória de Souza - Orientadora, para julgar o trabalho final "Papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil", da aluna **Zélia Menezes Garcia**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Paulo César Peregrino Ferreira - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2015.

Prof. Flávio Almeida Amaral

Flávio Almeida Amaral

Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Valbert Nascimento Cardoso

Dr. Luis Carlos Crocco Afonso

Luis Carlos Crocco Afonso

Dra. Regina Pekelmann Markus

Regina Pekelmann Markus

Profa. Daniele da Glória de Souza (Orientadora)

Daniele da Glória de Souza

09/03/14

PCPF

Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Coordenador

Dedicatória

Dedico essa tese ao pequenino Rubem, maior amor e inspiração da minha vida. Ao meu esposo Davi, cúmplice desta conquista. À minha mãe Ester e irmãos Anselmo e Elmo meus fiéis companheiros e apoiadores.

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estava sempre começando...

A certeza de que era preciso continuar...

A certeza de que seria interrompida antes de terminar.”

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração desse trabalho. Uma das coisas mais importante que aprende durante esses anos no meio científico, foi que ciência não se faz sozinha. *“Se vi mais longe foi porque me apoiei nos ombros de gigantes.”* Isaac Newton. Desta forma, eventualmente, nem todos os nomes dos que contribuíram com esse trabalho vão aparecer aqui, peço desculpas e deixo claro que esse trabalho foi resultado de uma equipe incrível, da qual tenho muito prazer de participar.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Danielle da Glória de Souza, pela excelente orientação, plena de competência e profissionalismo, imprescindível na minha formação científica e, sobretudo pela confiança, amizade e principalmente pelos bons conselhos em momento tão indecisos da minha vida. E ainda agradeço a sua compreensão e carinho em momentos críticos durante esses 6 anos de convivência.

Agradeço ao meu co-orientador, Dr. Caio Tavares Fagundes, pela também excelente orientação, valiosas discussões, pelas dicas, os artigos e muito mais. Em especial por ouvir o penso, e discutir essas ideias.

Agradeço ao Prof. Dr. Mauro Martins, pela acolhida, carinho, convívio e discussões importantes e essenciais para a execução dessa tese.

Agradeço às minhas queridas amigas, Raquel e Renata que tornaram minha vida tão prazerosa no laboratório. Senti-me muito mais do que feliz por dividir esses anos com vocês. Vocês sempre estiveram presentes comigo, fosse à bancada, no delineamento do experimento, nos complicados cálculos de molaridade e concentração, na troca de caixas de animais, no fluxo fazendo o “limpo” e “sujo”. E mais do que isso, dividimos juntas os medos, as ansiedades e frustrações, bem como as alegrias, as conquistas e os anseios da nossa vida. Resumindo é e foi bom demais estar com vocês.... *“Feliz aquele que encontra um amigo”*

Agradeço à pequena Camila, pela amizade, ajuda e apoio sempre. Sua companhia e ajudar foram essenciais para essa tese.

Agradeço ao Rafael Barros de forma muito especial por me direcionar na condução dessa tese, pelas preciosas discussões científicas e pelas dicas de microbiologia. Seu apoio foi essencial para esse trabalho.

Agradeço ao Leo Acúrcio pelo apoio, imprescindível ajuda e ensinamento na execução dos experimentos de cultura de bactérias. Ao prof. Jacques Nicoli pela disponibilização das bactérias e discussões.

Agradeço ao Laboratório Núcleo de Estudo em Inflamação e a Inês por gentilmente não permitir utilizar os equipamentos de histologia.

Agradeço ao Flávio e ao Leandro pela ajuda na obtenção dos dados de carragenina e discussões.

Agradeço à Alana, à Natália pela ajuda na execução desse trabalho.

Agradeço à Luana e ao Celso pela ajuda na obtenção dos resultados de histologia. Ao Talles pelos primeiros ensinamentos no cuidado com os animais *germ free*.

Agradeço à Ana Carol por me ajudar e ensinar a obter os resultados de PCR.

Agradeço à Gil e à Frank, pelo companheirismo e pela amizade. Á Ilma e à Tânia por possibilitar um ambiente de trabalho adequado e por toda a ajuda diária.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Imunofarmacologia, por estarem sempre pronto a ajudar e tornar o laboratório um ótimo lugar para se trabalhar.

Agradeço à Paty Campi, ao Lucas, ao Thiago, à Vivi, à Lívia Tavares e Lívia Resende, à Lud, à Mila, à Silvinha, ao Daniel e à TODOS os companheiros do Laboratório de Interação Microrganismo Hospedeiro. Todos os dias eu tenho prazer em ir para o laboratório, pois sei que vou encontrar pessoas alegres e amáveis que tornam o nosso laboratório um ótimo lugar de se trabalhar.

Agradeço a todos os amigos e colegas do programa da pós-graduação em Microbiologia pela agradável convivência durante as disciplinas.

Agradeço aos pesquisadores por aceitarem participar da banca e possibilitarem o meu crescimento e aprimoramento.

Agradeço à Capes, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Agradeço aos amigos “externos” e familiares por proporcionarem momento de lazer, descontração, companheirismo e apoio.

Agradeço à Profa. Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira, a Dadá. Sou imensamente grata a você. Se hoje estou aqui terminando esse trabalho é porque você sempre me apoia e acreditou em mim mesmo quando trocava reagente e estragava todo o seu experimento. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pela troca de ideias, amizade adquirida, por ajudar-me a pensar como uma “cientista” e me levar sempre com você.

Agradeço às amigas do Laboratório de Metabolismo Celular, Laura e Érica pelos primeiros ensinamentos científicos, pela confiança e amizade. Gosto muito de vocês. Em especial gostaria de agradecer a Érica pelo constante apoio e ajuda.

Agradeço à Profa. Dra. Leida Botion, por dar a oportunidade de entrar no mundo científico.

Agradeço ao Dr. Milton Afonso por cuidar de mim quando ainda pequena, pagar meus estudos e me permitir sonho com um futuro melhor. Agradeço ao Lar de Meninas Ellen G. White, local em que estive e onde aprendi que a vida podia ser melhor quando pagamos o preço pelos nossos sonhos.

Agradeço à Deus, a razão primária de tanto ter a agradecer.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:

5-FU - 5-fluorouracil

AB-A - Animais adultos tratados com antibióticos

AB-C - Animais tratados com antibióticos controle

AB-5-FU - Animais tratados com antibiótico e 5-FU

ANXA-1- anexina-1

BBE – meio de cultura: bacteróides bile esculina

BHI – meio de cultura (*brain heart infusion*)

C – Controle

CCL11 – quimiocina ligadora de motivo C-C 11 (eotaxina)

CCL24 - quimiocina ligadora de motivo C-C 24 (eotaxina-2)

CLRs – receptor do tipo lecitina

CPT-11 – irinotecano

CV-C – animais convencionais tratados com veículo

CV-5-FU – animais convencionais tratados com quimioterápico 5-FU

CXCL1(KC) – quimiocina ligadora de motivo C-X-C 1 (*keratinocyte chemoquine;*)

DHFU - dihidroflourouracil

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxinucleotídeo

DPD - enzima dihidropirimidina desidrogenase

dTMP - desoxitimidina monofosfato

dUMP - desoxiuridina monofosfato

dUTP - desoxiuridina trifosfato

ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*

EPO – peroxidase eosinofílica

FdUMP - fluorodesoxiuridina monofosfato

FdUTP - fluorodesoxiuridina trifosfato

FUTP - fluorouridina trifosfato

GALT- tecido linfóide associado à mucosa gastrointestinal

GCs - glicocorticoides

GF-C – animais isentos de germes tratados com veículo

GF-5-FU – animais isentos de germes tratados com o quimioterápico 5-FU

GR - receptor de glicocorticoide

IgA - imunoglobulina A

IgG- imunoglobulina G

IKK- quinase inibidora de κ B

H&E- Hematoxilina e eosina

IL-1 β - interleucina 1 β

IL-10- interleucina 10

IL-18 - interleucina 18

IL-33 - interleucina 33

IBDs – doenças inflamatórias intestinais (*inflammatory bowel diseases*)

LPS- lipopolissacarídeo

LXA4 - lipoxina A4

MAMPS - receptores de padrões moleculares conservados associados a micróbios

MPO – mieloperoxidase

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

MRS - meio de cultura: De Man, Rogosa e Sharpe

NF- κ B- fator nuclear kappa B

NOD- domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo

P53- proteína 53

PBS – tampão fosfato-salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PAF - fator de ativação plaquetária

PPAR γ - receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo gama

PPR - receptores de reconhecimento a patógenos

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

RNS – espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species*)

rRNA - ácido ribonucleico ribossômico

RU468 – Mifepristone - antagonista do receptor de glicocorticoide

SEM – média do erro padrão

TLRs - *toll like receptors*

TNF α - fator de necrose tumoral alfa

TS – timidilato sintase

UFCs – unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS.....	6
RESUMO	7
ABSTRACT	7
1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Mucosite intestinal	11
2.2 O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU).....	14
2.3 A inflamação na mucosite	18
2.4 Microbiota intestinal e Resposta inflamatória	20
2.5 Microbiota e mucosite	31
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral:	35
3.2 Objetivos específicos:	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Animais	38
4.2 Drogas	39
4.3 Indução de mucosite intestinal experimental	39
4.4 Avaliação do comprimento do intestino e graduação clínica da doença	39
4.5 Histologia	40
4.6 Contagem total de leucócitos	41
4.7 Análise do índice de hematócrito	41
4.8 Ensaio de MPO para quantificação de influxo de neutrófilos	41
4.9 Ensaio de EPO para quantificação de influxo de eosinófilos	42
4.10 Extração de citocinas do intestino	42
4.11 Determinação da concentração de citocinas por ELISA	43
4.12 Avaliação da expressão do mRNA de <i>il-10</i> e <i>anexina-1</i>	44
4.13 Depleção da microbiota por coquetel de antibióticos.....	44
4.14 Reposição da microbiota total em animais isentos de germes.....	45
4.15 Avaliação da composição da microbiota intestinal	45
4.16 Tratamento com os antibióticos Ciprofloxacino, Metronidazol e Vancomicina	46
4.17 Colonização específica	46
4.18 Modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por carragenina.....	46
4.19 Tratamento com dexametasona e RU486.....	47
4.20 Dosagem de corticosterona plasmática	47
4.21 Análise Estatística	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1 A dose de 450 mg/kg de 5-fluorouracil induziu grave dano intestinal	49

5.2 A ausência da microbiota está associada com redução da lesão e da inflamação intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU.....	53
5.3 <i>Escherichia coli</i> exacerba o dano intestinal induzido pelo quimioterápico 5-FU.....	69
5.4 A corticosterona é importante para a hiporresponsividade inflamatória dos animais GF.....	79
6. DISCUSSÃO.....	83
7. REFERÊNCIA.....	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases de desenvolvimento da mucosite.

Figura 2: Representação estrutural das bases pirimidinas uracila, timina e do 5-fluorouracil, uma análogo fluorado das bases pirimidinas.

Figura 3: Esquema representativo dos mecanismos antineoplásicos do 5-fluorouracil.

Figura 4: Representação da microbiota por filo em diferentes segmentos do trato gastrointestinal.

Figura 5: A microbiota indígena induz resposta imune tolerante e conferi vários benefícios para o hospedeiro enquanto a microbiota disbiótica está associada ao desenvolvimento de várias doenças.

Figura 6: Avaliação do fenótipo de camundongos convencionais submetidos a teste de dose resposta do quimioterápico 5-fluorouracil.

Figura 7: Cortes histológicos do duodeno de camundongos controle e com mucosite.

Figura 8: Curva percentual de sobrevivência dos camundongos convencionais após 3 dias de tratamento com 450 mg/kg de 5-fluorouracil.

Figura 9: Ausência de microbiota está associada a diminuição da resposta inflamatória após administração do quimioterápico 5-FU.

Figura 10: Representação histológica e graduação histopatológica do jejuno de camundongos convencionais (CV) ou isentos de germes (GF) controle (C) ou tratados com o quimioterápico (5-FU).

Figura 11: Percentagem de sobrevivência após administração de 5-FU a animais convencionais (CV) e isentos de germes (GF)

Figura 12: Expressão do mRNA de *anexina1* (A) e de *il-10* (B)

Figura 13: A prevenção da colonização de camundongos neonatos pelo microbiota resultou em diminuição da inflamação e da lesão tecidual induzido pelo quimioterápico 5-FU.

Figura 14: Representação histológica (A) e graduação histopatológica (B) do intestino de camundongos convencionais (CV), isentos de germes (GF) e CV tratados desde o nascimento com coquetel de antibióticos (AB) controle (C) ou tratados com o quimioterápico (5-FU).

Figura 15: Avaliação fenotípica dos camundongos convencionais adultos tratados com coquetel de antibióticos (AB-A) por 30 dias e injetados com o quimioterápico 5-FU.

Figura 16: Cortes histológicos do duodeno de camundongos tratados com 5-FU convencionais (CV) e adultos pré-tratados com antibióticos (AB).

Figura 17: Fenótipo dos animais GF convencionalizados (CV→GF) com fezes de camundongos convencionais por 30 dias e tratados com o quimioterápico 5-FU.

Figura 18: Cortes histológicos do duodeno de camundongos GF convencionalizados controle tratados com o 5-FU e graduação histopatológica.

Figura 19: Perfil bacteriano presente nas fezes de camundongos convencionais tratados com o quimioterápico 5-FU.

Figura 20: Efeito do tratamento concomitante de 5-FU e dos antibióticos ciprofloxacino (cipro), metronidazol (metro) e vancomicina (vanco).

Figura 21: Avaliação do fenótipo de animais GF monocolonizados com *E. coli* e *B. fragilis* e tratados com 5-FU para indução da mucosite intestinal.

Figura 22: Cortes histológicos do duodeno de camundongos CV (A), GF (B) e GF monocolonizados com *E. coli* (C) e *B. fragilis* (D) e tratados com quimioterápico 5-FU.

Figura 23: Análise de parâmetros inflamatórios 3h após injeção de carragenina em camundongos GF monocolonizados com *B. fragilis* e *E. coli*.

Figura 24: Efeito do tratamento concomitante de 5-FU e dexametasona (dexa).

Figura 25: Efeito do tratamento concomitante de 5-FU e do RU486.

Figura 26: Efeito da monoclonização sobre a concentração plasmáticos de corticosterona após tratamento com o quimioterápico 5-FU.

Figura 27: Representação esquemática dos eventos envolvidos na proteção e exacerbação da mucosite induzida por 5-FU na ausência e presença da microbiota, respectivamente.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos iniciadores para IL-10 e anexina 1 usados no qPCR.

Tabela 2: Sequência dos iniciadores de rDNA do gene 16S usados no qPCR.

RESUMO

A mucosite induzida no trato gastrointestinal pelo tratamento antineoplásico constitui um importante, dose limitante e dispendioso efeito colateral da quimioterapia e radioterapia, podendo acarretar na interrupção e/ou postergação do tratamento. A microbiota presente no trato gastrointestinal está envolvida em várias doenças inflamatórias intestinais, entretanto não se sabe seu papel no desenvolvimento da mucosite. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU). O tratamento com 5-FU em animais convencionais (CV) resultou em inflamação e dano intestinal. A fim de avaliar o papel da microbiota na mucosite utilizamos animais isentos de germes (GF) e tratados com coquetel de antibióticos para a depleção da microbiota (AB). A ausência da microbiota, em ambos modelos, foi associada a menor inflamação e preservação do tecido intestinal após tratamento com 5-FU. O dano tecidual induzido pelo 5-FU nos animais CV foi associado ao aumento do número de enterobactérias e de *Escherichia coli* nas fezes. A prevenção do aumento de enterobactérias, através do tratamento com ciprofloxacino, preveniu o dano tecidual induzido pelo 5-FU nos animais CV. A colonização dos animais GF com a microbiota total ou a monocolonização com *E. coli* foram eficientes em reverter o fenótipo protetor desses animais após tratamento com 5-FU e promover a inflamação e dano tecidual. Animais GF apresentam aumento da concentração basal de corticosterona e a monocolonização com *E. coli* reduziu a concentração desse hormônio durante a mucosite. Nossos dados demonstram que ausência da microbiota protege os animais dos danos induzidos pelo 5-FU. Em animais convencionais o aumento de enterobactérias e *E. coli* exacerba o dano tecidual induzido pelo 5-FU. O aumento de *E. coli* pode inibir o aumento de corticosterona e exacerbar os efeitos do quimioterápico.

ABSTRACT

Antineoplastic-induced mucositis in gastrointestinal tract is an important and costly dose-limiting side effect of chemotherapy and radiotherapy and may result in disruption and/or delay of treatment. The microbiota present in the gastrointestinal tract is involved in several inflammatory bowel diseases, however its role in mucositis development is not known. The aim of this study was to investigate the role of the microbiota in the development and severity of 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy-induced mucositis. Conventional mice (CV) treated with 5-FU showed intestinal inflammation and tissue damage. In order to assess the role of the microbiota in mucositis we use germ-free mice (GF) and mice treated with an antibiotics cocktail for microbial depletion (AB). Absence of microbiota in both models was associated with reduced inflammation and gut tissue preservation after 5-FU treatment. 5-FU-induced tissue damage in CV mice was associated with increased content of enterobacteria and *E. coli* in the feces. Prevention of enterobacteria increase in CV mice by ciprofloxacin treatment prevented 5-FU-induced tissue damage. Colonization with whole microbiota or *E. coli* monocolonization of GF mice were effective in reversing the protective phenotype of these animals after 5-FU treatment promoting inflammation and tissue damage. GF animals showed increased basal corticosterone concentration and monocolonization with *E. coli* reduced the concentration of this hormone after mucositis induction. Our data demonstrate that microbiota absence protects the mice from 5-FU-induced damage. Increase of enterobacteria and *E. coli* in CV mice exacerbate 5-FU-induced tissue damage. *E. coli* increase can inhibit the corticosterone increase and exacerbate chemotherapy effects.

1. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A mucosite é um dos efeitos colaterais mais indesejados dos tratamentos antineoplásicos por quimioterápicos e/ou radioterápicos. Essa condição é caracterizada tanto por inflamação quanto pela perda de células da barreira epitelial do trato gastrointestinal. Clinicamente a mucosite está associada a vários sintomas como dor abdominal intensa, náuseas, sangramento, diarreia grave e inanição, podendo acarretar na diminuição ou interrupção do tratamento antitumoral. Todas essas complicações resultam em maior período de hospitalização, aumento do custo para o sistema de saúde e mortalidade.

A mucosite ocorre numa região colonizada por um número astronômico de microrganismos comensais e mutualísticos. Esses microrganismos formam uma complexa comunidade denominada de microbiota indígena. No trato gastrointestinal ocorre uma interação dinâmica entre o hospedeiro e componentes da microbiota indígena. A microbiota contribui de forma proeminente para vários processos fisiológicos do hospedeiro, tais como resistência a colonização oportunista ou microrganismos patogênicos, captação de nutrientes e imunomodulação. A microbiota indígena representa um importante sinal para a maturação do sistema imune, como o desenvolvimento da função imune das células epiteliais, maturação dos tecidos linfoides associados ao intestino (GALTs), recrutamento de células secretoras de IgA e ativação de células T na mucosa. Por outro, alterações na composição da microbiota indígena, denominada disbiose, estão envolvidas no desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias intestinais (IBDs – Inflammatory Bowel Diseases), tais como colite, doença Crohn e doença celíaca. Em relação à mucosite também há relatos da ocorrência de alteração na composição da microbiota tanto oral quanto intestinal, entretanto esses dados ainda são inconsistentes e

pouco conclusivos. Vale a pena ressaltar que a disbiose observada durante a mucosite é apontada por muitos autores como sendo importante para o desencadeamento do quadro de diarreia presente nos pacientes com mucosite. Entretanto a avaliação direta de taxa microbianos, bem como, do papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite, principalmente a intestinal, ainda precisam ser elucidados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mucosite intestinal

A mucosite é um dos principais efeitos colaterais decorrentes dos tratamentos antineoplásicos com quimioterápicos e radioterápicos. Patologicamente, a mucosite é caracterizada tanto pela inflamação quanto pela perda de células da barreira epitelial do trato gastrointestinal, se estendendo da região da boca até o ânus (van Vliet *et al.*, 2010). A ocorrência de mucosite é extremamente comum, acometendo aproximadamente 40% dos pacientes após tratamento com doses padrão de quimioterapia e em quase todos os pacientes submetidos a altas doses de quimioterápicos (Blijlevens *et al.*, 2000; Sonis, 2004). Historicamente, as pesquisas têm focado na mucosite oral. Apenas mais recentemente os sintomas e a patofisiologia da mucosite intestinal passaram a ser estudados pela comunidade científica (van Vliet *et al.*, 2010).

Embora não haja nenhum dado confiável da incidência de mucosite intestinal (Barzal *et al.*, 2014), quase todos os pacientes recipientes de transplantes são afetados em alguma extensão e desenvolvem manifestações clínicas da mucosite intestinal que incluem náuseas, vômitos, dor abdominal intensa, diarreia grave acompanhada de perda visível de sangue e/ou muco (Blijlevens *et al.*, 2005; Lutgens *et al.*, 2005). Como consequência desse processo pode-se citar alterações no transporte transepitelial, mudanças na função da barreira intestinal e disfunção da motilidade resultando em prejuízo da absorção de nutrientes (Butler, 2000). A mucosite intestinal ainda pode ser associada a bacteremia, ulcerações, desnutrição, aumento da prescrição de nutrição parenteral e de analgésicos resultando em redução da qualidade de vida do paciente. Todas essas complicações levam a um maior período de hospitalização e aumento do custo para o sistema de saúde. Além disso, a mucosite frequentemente resulta em redução da dosagem de quimioterápicos e/ou postergação do tratamento, e constitui uma das principais causas de morbidade e

mortalidade para muitos dos pacientes que estão em tratamento para o câncer (Sonis *et al.*, 2001).

O uso de drogas antitumorais visa primariamente destruir as células neoplásicas. Entretanto, atualmente, as drogas utilizadas na quimioterapia e a radioterapia são extremamente inespecíficas, e agem tanto nas células neoplásicas quanto nas outras células íntegras do organismo, levando a vários efeitos colaterais indesejados, como mucosite, leucopenia e neutropenia (Ikuno *et al.*, 1995). A maioria das drogas antineoplásicas age em diferentes fases do processo de divisão celular, interferindo na duplicação do DNA (Lake & Robinson, 2005). Os efeitos colaterais desses tratamentos ocorrem principalmente nas células do organismo que apresentam alta taxa mitótica, como as células epiteliais, que são continuamente renovadas ao longo do trato gastrointestinal (Lheureux & Moulec, 2011) e nas células hematopoiéticas (Ikuno *et al.*, 1995). O epitélio intestinal é composto de quatro linhagens de células originadas continuamente de células-tronco progenitoras pluripotentes presente na cripta: os enterócitos de absorção, que são a maioria das células epiteliais; as células caliciformes, produtoras de muco; as células enteroendócrinas, produtoras de hormônios; e as células de Paneth, produtoras de peptídeos antimicrobianos (Artis, 2008; Hooper & Macpherson, 2010). A morte das células basais resulta na falha da reposição compensatória das células diferenciadas do epitélio intestinal resultante da esfoliação natural das mesmas (Barzal *et al.*, 2014).

O dano ao DNA provocado pelo uso de quimioterápicos induz vários dos fatores que contribuem para a patogênese da mucosite, incluindo a maior secreção de citocinas inflamatórias, aumento da apoptose das células epiteliais, alteração da microbiota intestinal e dano ao epitélio (Figura 1). Duncan & Grant (2003) propuseram quatro fases que descrevem a fisiopatologia da mucosite intestinal: Resumidamente, na fase inicial (iniciação), a quimioterapia danifica o DNA, o que afeta as células progenitoras da cripta, e

induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Isso resulta em morte celular, perda da barreira epitelial, ativação e influxo de células inflamatórias e aumento na produção de mediadores inflamatórios. Na segunda fase, ocorre aumento do processo de apoptose e perda progressiva de células da cripta e da superfície de absorção. Na terceira fase, ou fase de ablação, ocorrem alterações estruturais das criptas e ulceração. Isso pode resultar em invasão pela microbiota indígena presente no lúmen do trato gastrointestinal e exacerbação do processo inflamatório; a última fase é a de recuperação, na qual, após cessar a aplicação do quimioterápico, ocorre a restauração das criptas, estruturação e funcionalização dos vilos e recuperação das superfícies absorptivas do intestino. Esse processo é direcionado por sinais oriundos das células mesenquimais e da matriz extracelular (Ducan & Grant, 2003).

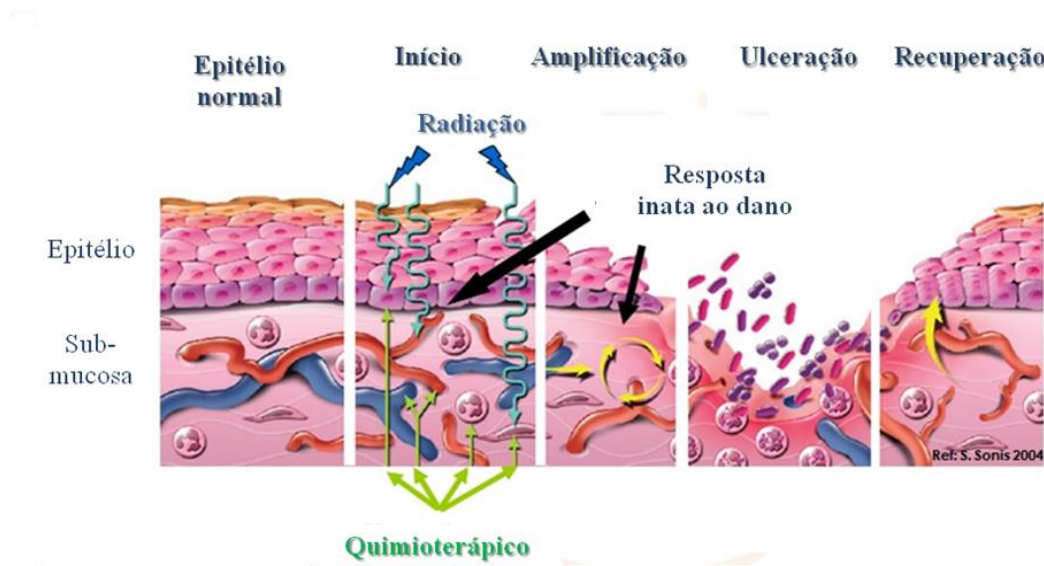


Figura 1: Fases de desenvolvimento da mucosite. A mucosite, induzida por radioterápicos e quimioterápicos, é iniciada por dano direto ao DNA de células epiteliais basais resultado na sua morte. Em resposta ao dano tecidual ocorre geração de espécies reativas de oxigênio e ativação do fator de transcrição nuclear κB (NF- κB) no endotélio, fibroblastos e epitélio. Nesse contexto ocorre a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que acentua a lesão

tecidual. Essas moléculas amplificam o efeito inicial dos agentes antineoplásicos. O dano as células basais resulta na perda da capacidade de renovação das células epiteliais. Em consequência ocorre perda da integridade do epitélio levando a erosão e ulceração do mesmo. As bactérias presentes no lúmen passam entram em contato com a lâmina própria e amplificam a resposta inflamatória. Em muitos casos, após cessar a administração do quimioterápico, ocorre a recuperação do epitélio dirigido por sinais das células mesenquimais e da matriz extracelular. Figura adaptada e acessada em 12-12-2014 no site <http://scr.zacks.com>.

2.2 O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU)

Vários quimioterápicos induzem mucosite intestinal em roedores, como o 5-fluorouracil (5-FU), doxorrubicina e o irinotecano (CPT-11). O 5-FU é extensamente utilizado na clínica no tratamento de vários cânceres, como o gastrointestinal, de mama, de cabeça e pescoço (Longley *et al.*, 2003). O uso do 5-FU na clínica tem evidenciado que a resposta a esse quimioterápico varia muito entre os pacientes. Alguns pacientes desenvolvem poucos efeitos colaterais, enquanto outras apresentam vários, que podem levar a descontinuidade da terapia antineoplásica. Além da mucosite, o 5-FU também causa mielossupressão, dermatites, alopecia e toxicidade cardíaca, ocular, hepática e neurológica (Gradishar & Vokes, 1990). Dentre os efeitos adversos do 5-FU, a mucosite gastrointestinal é uma das principais complicações e afeta aproximadamente 80% dos pacientes em tratamento resultando em sangramento e dor abdominal, náuseas e diarreia (Sonis *et al.*, 2004).

Vários fatores e genes contribuem para a ocorrência da mucosite induzida pelo 5-FU (Chang *et al.*, 2012). Por exemplo, o aumento da apoptose e a diminuição da celularidade pelo 5-FU causam mudanças histológicas intestinais (Pritchard *et al.*, 1998). A formação de

ROS e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF α , levam a danos na mucosa (Sonis et al., 2004; Leitão *et al.*, 2007; Logan *et al.*, 2007). Adicionalmente, a produção do fator de ativação plaquetária (PAF) participa da patogênese da mucosite (Soares *et al.*, 2011).

O 5-FU é uma droga antimetabólica pertencente à classe dos fármacos análogos a pirimidina com um átomo de flúor na posição C-5 em substituição ao átomo de hidrogênio ou ao grupo metil (Figura 2). Os antimetabólicos agem inibindo a síntese de macromoléculas, como DNA e RNA, ou se incorporando a essas moléculas. A ação do 5-FU é interrompida pela sua conversão a dihidroflourouracil (DHFU) mediada pela enzima dihidropirimidina desidrogenase (DPD). Mais de 80% do 5-FU administrado é normalmente catabolizado no fígado durante a primeira passagem, onde a DPD é mais abundantemente expressa (Diasio & Harris, 1989). Devido a essa rápida metabolização, a meia vida do 5-FU é de cerca de 20 minutos.

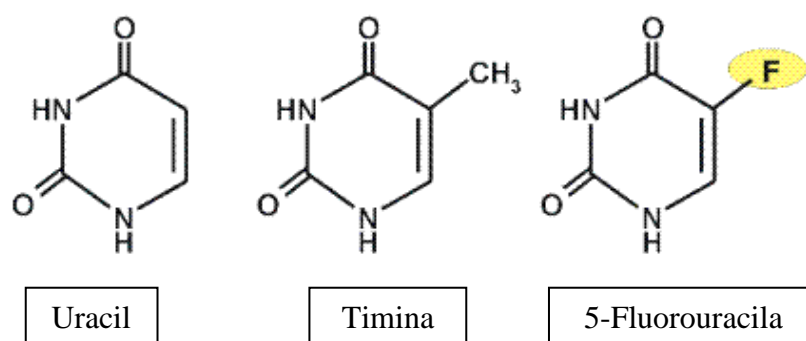


Figura 2: Representação estrutural das bases pirimidinas uracila, timina e do 5-fluorouracil, uma análogo fluorado das bases pirimidinas.

A entrada do 5-FU na célula ocorre mediante mecanismos de transporte facilitado utilizado pela uracila (Wohlhueter *et al.*, 1980). A ação do 5-FU é mediada por vários

metabólitos ativos gerados intracelularmente: fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). Esses metabólitos atuam de duas maneiras: (i) inibindo a atividade da enzima timidilato sintase (TS) e consequentemente diminuindo a produção de desoxitimidina e levando ao acúmulo do desoxiuridina; (ii) sendo incorporado ao DNA e/ou RNA da célula, impedindo seu funcionamento normal e induzindo a apoptose celular via ativação da p53 (Figura 3) (Longley *et al.*, 2003; Savva-Bordalo *et al.*, 2010).

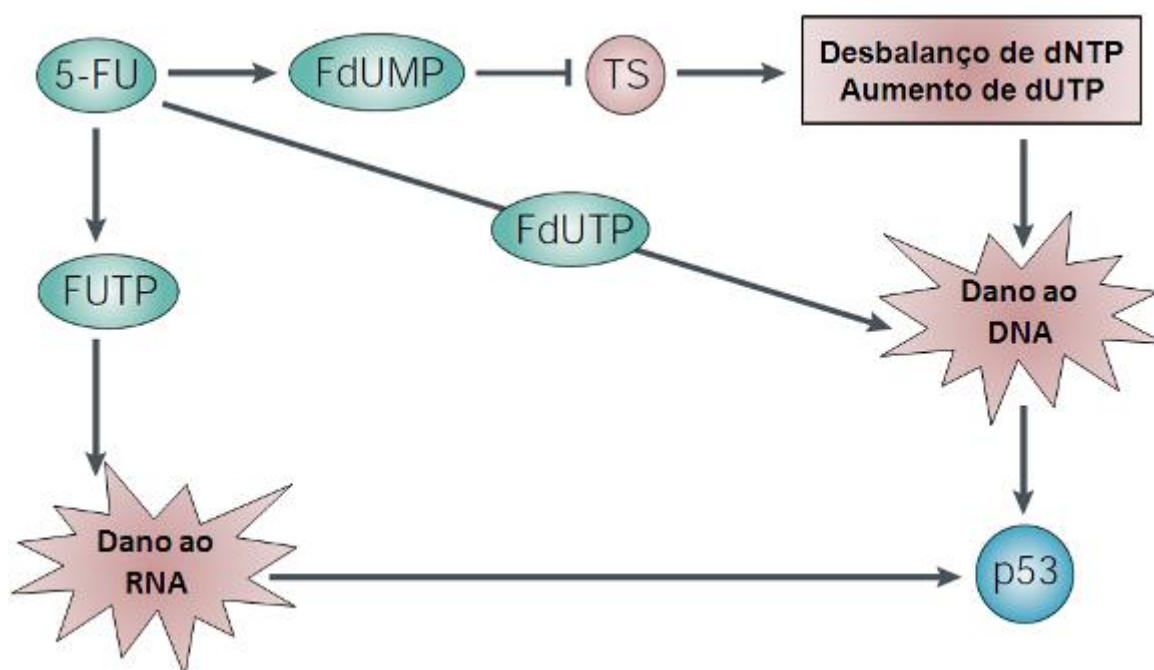


Figura 3: Esquema representativo dos mecanismos antineoplásicos do 5-fluorouracil (5-FU). O 5-FU pode induzir a morte celular via a ativação da p53 por mais de um mecanismo: incorporação de fluorouridina trifosfato (FUTP) ao RNA, incorporação de fluorodesoxiuridina trifosfato (FdUTP) ao DNA e inibição da timidilato sintase (TS) devido a ligação estável com a fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP). Essa inibição resulta no desbalanço de desoxinucleotídeos (dNTP) e aumento de desoxiuridina (dUTP). Figura modificada de Longley *et al.*, 2003.

A enzima timidilato sintase catalisa a metilação do desoxiuridina monofosfato (dUMP) a desoxitimidina monofosfato (dTMP) mediante a redução do folato 5,10 metilenotetrahidrofolato (CH₂THF), como doador de metil. Essa reação é a única fonte *de novo* de timidilato necessário para o reparo e síntese de DNA. A enzima timidilato sintase funciona como um dímero e ambas as subunidades apresentam sítios de ligação para a dUMP e para o folato. O metabólito do 5-FU, FdUMP, se liga ao sítio de ligação do dUMP, formando um complexo ternário estável com a enzima e o folato, impedindo assim a ligação do dUMP e conseqüentemente a síntese de dTMP (Sommer & Santi, 1974; Santi *et al.*, 1974).

A depleção de dTMP gerada pelo 5-FU resulta em diminuição da produção do nucleotídeo desoxitimidina trifosfato e alteração da concentração de outros nucleotídeos devido a mecanismos de retroalimentação. Esse desequilíbrio nas concentrações dos nucleotídeos promove grave dano a síntese e ao reparo do DNA (Houghton *et al.*, 1995). Além disso, a inibição da enzima timidilato sintase promove acúmulo de dUTP, que pode ser incorretamente incorporado ao DNA juntamente com metabólitos do 5-FU (Mitrovski *et al.*, 1994) podendo resultar na quebra da fita de DNA e morte celular.

O metabólito do 5-FU, FUTP, é extensivamente incorporado ao RNA alterando seu funcionamento e processamento, resultado em toxicidade para o RNA em diversos níveis. Essa toxicidade ocorre não apenas no pré-processamento do pré-RNA a RNA maduro, mas também no processamento pós-transcricional do rRNA e mRNA (Longley *et al.*, 2003).

O dano celular induzido pelo 5-FU está associado a intensa resposta inflamatória na mucosa, entre outros (von Bultzingslowen *et al.*, 2003; Stringer *et al.*, 2009).

2.3 A inflamação na mucosite

A inflamação é um componente proeminente no dano causado à mucosa durante os tratamentos antineoplásicos, como pode ser observado no modelo de 4 fases de desenvolvimento da mucosite (Duncan & Grant, 2003) (Figura 1). Nesse contexto, alguns pesquisadores têm sugerido que o fator de transcrição nuclear NF- κ B tem papel central no desencadeamento de várias vias de sinalização pró-inflamatórias, como na síntese de citocinas (Sonis *et al.*, 2004; Logan *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2012). Tanto o tratamento quimioterápico quanto o radioterápico são capazes de ativar NF- κ B nas células epiteliais, mesenquimais, endoteliais e em macrófagos (Sonis, 2004). Logan e colaboradores (2007) demonstraram que o aumento da expressão de NF- κ B precede o pico das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β e IL-6 na mucosite oral e intestinal induzida por quimioterápicos. Em outro estudo, camundongos tratados com um inibidor de NF- κ B apresentaram menor dano tecidual, diminuição da concentração de IL-1 β e do acúmulo de neutrófilos no intestino, além de menor dano tecidual após administração de 5-FU (Chang *et al.*, 2012). Esses achados reforçam a hipótese de que a ativação de NF- κ B é um elemento central para a inflamação da mucosa induzida por quimioterapia e radioterapia.

Recentemente, tem sido demonstrado a participação de algumas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na patogênese da mucosite, como TNF α , IL-1 β , IL-6, CXCL1 e IL-33. A expressão gênica e a concentração de TNF α e IL-1 β foram correlacionadas ao dano à mucosa oral e intestinal após radiação (Sonis *et al.*, 2000; Sonis *et al.*, 2002). As citocinas TNF α , IL-6, CXCL1, IL-1 β , IL-18 e IL-33 também foram associadas ao desenvolvimento de mucosite intestinal induzida por quimioterápicos (Logan *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011; Arifa *et al.*, 2014; Guabiraba *et al.*, 2014). Wu e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com antagonista do receptor de IL-1 reduz a apoptose e a letalidade e atenua a mucosite induzida por 5-FU em

camundongos (Wu *et al.*, 2011). Dados do nosso grupo também demonstram que a ativação de inflamassoma, um complexo proteico citoplasmático que regula a maturação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18, tem papel importante no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano (Arifa *et al.*, 2014). A inibição de TNF α , IL-1 β e CXCL1 também resultaram em diminuição da patogênese da mucosite induzida por irinotecano (Melo *et al.*, 2008). Em outro trabalho foi demonstrado que a IL-33 é produzida pelas células epiteliais do intestino de camundongos tratados com irinotecano. E ainda o uso de anti-IL-33 ou ainda de antagonista ou a deleção do receptor para essa citocina resultaram em atenuação do dano intestinal induzido pelo quimioterápico (Guabiraba *et al.*, 2014). Esses estudos, em conjunto, confirmam a participação das citocinas IL-1 β , TNF α , IL-6, CXCL1 e IL-33 na patogênese da mucosite induzida por quimioterápicos em camundongos.

McManus e colaboradores (1993) demonstraram aumento da atividade do fator de ativação plaquetária (PAF) na saliva de pacientes com mucosite oral induzida por radioterapia, evidenciado o aumento da concentração desse mediador inflamatório durante a mucosite (McManus *et al.*, 1993). Em outro estudo, Soares e colaboradores demonstraram atenuação do dano à mucosa intestinal após tratamento com 5-FU em camundongos com deleção genética do receptor para PAF ou tratados com antagonista desse receptor (Soares *et al.*, 2011).

Durante a mucosite ocorre mudança no balanço entre as citocinas anti e pró-inflamatórias, pendendo mais para o estado pró-inflamatório. As citocinas anti-inflamatórias podem inibir diretamente a secreção de mediadores pró-inflamatórios e serem usados no tratamento da mucosite. A IL-10 é uma das citocinas anti-inflamatórias mais estudadas na mucosite. De Koning e colaboradores (2006) demonstraram que animais deficientes para IL-10 apresentam maior perda de peso e lesão intestinal mais grave após

tratamento com quimioterápico metotrexato em relação grupo selvagem (de Koning *et al.*, 2006). Além da IL-10, outras moléculas como IL-11, RDP58 e CXCL-9 também podem estar envolvidas na proteção do trato gastrointestinal em modelo animal de mucosite (Zhao *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005, 2011).

Durante a mucosite é observado infiltrado de leucócitos na lâmina própria com acúmulo de neutrófilos e eosinófilos (Sonis, 2004). Trabalhos mais recentes têm confirmado que neutrófilos e eosinófilos têm papel importante na patogênese da mucosite (Guabiraba *et al.*, 2014; Arifa *et al.*, em preparação). Guabiraba e colaboradores (2014) demonstraram que a prevenção do influxo de neutrófilos para o intestino durante tratamento com irinotecano resultou em atenuação do mucosite induzida por esse quimioterápico em camundongos. Em relação ao eosinófilo, a ausência do acúmulo dessas células no tecido, seja em animais com depleção genética ou tratados com Evasina-4 (proteína que se liga as quimiocinas CCL11 e CCL5, quimiotática para eosinófilos) resultou em menor lesão intestinal (Arifa *et al.*, em preparação). Na fase tardia, é observado acúmulo de macrófagos na submucosa, principalmente macrófagos RM3/1, os quais estão associados com a resolução e reparo do tecido (Handschel *et al.*, 2001; Sonis 2004). A presença dos leucócitos no trato gastrointestinal durante a mucosite pode ser importante para manutenção da resposta inflamatória, uma vez que esse tipo celular produz diversos mediadores inflamatórios, que amplificam e mantem a resposta inflamatória. Além disso, os leucócitos são importante fonte produtora de espécies reativas (Mittal *et al.*, 2014).

2.4 Microbiota intestinal e Resposta inflamatória

Como exposto acima, a resposta inflamatória é importante para o desenvolvimento da mucosite. A montagem de uma resposta inflamatória adequada bem como o desenvolvimento do sistema imune é dependente da colonização bacteriana intestinal (Souza *et al.*, 2004, 2007; Fagundes *et al.*, 2012).

Os metazoários são colonizados por uma variedade de microrganismos. A colonização desses nichos se inicia após o nascimento e é influenciada por vários fatores. Essa colonização pode ser positiva, como ocorre com muitas bactérias intestinais, ou negativa, comprometendo a saúde do hospedeiro, como ocorre nas doenças infecciosas (Penna *et al.*, 2008; Medzhitov, 2007). Os efeitos negativos dependem, dentre outros, do estado imune do hospedeiro, sendo que certos patógenos afetam apenas indivíduos imunossuprimidos.

Cerca de 90% das células presentes no corpo humano são microrganismos, muitos dos quais residentes em comunidades, coletivamente conhecidas como microbiota (Winter *et al.*, 2013). O intestino é o órgão mais amplamente colonizado, com cerca de 10^{13} a 10^{14} microrganismos na porção terminal. Essa comunidade é composta de pelo menos 500 diferentes espécies bacterianas, muitas das quais ainda são não cultiváveis (Eckburg *et al.*, 2005). Os anaeróbios obrigatórios compreendem a maior parte da microbiota intestinal em adultos e utilizam a fermentação de polissacarídeos complexos para replicar (Mahowald *et al.*, 2009). Aproximadamente 99% da microbiota gastrointestinal de humanos e de camundongos é dominada por bactérias dos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria. Verrucomicrobia e Cianobactéria são filos também detectados em humanos e camundongos (Figura 4) (Eckburg *et al.*, 2005; Lay *et al.*, 2005; Sartor, 2008). Além das bactérias, a microbiota intestinal também é composta por algumas espécies de arquea e fungos, como as *Methanobrevibacter* e *Candida albicans*, respectivamente (Fagundes *et al.*, 2011), bem como fagos e vírus (Guarner, 2012).

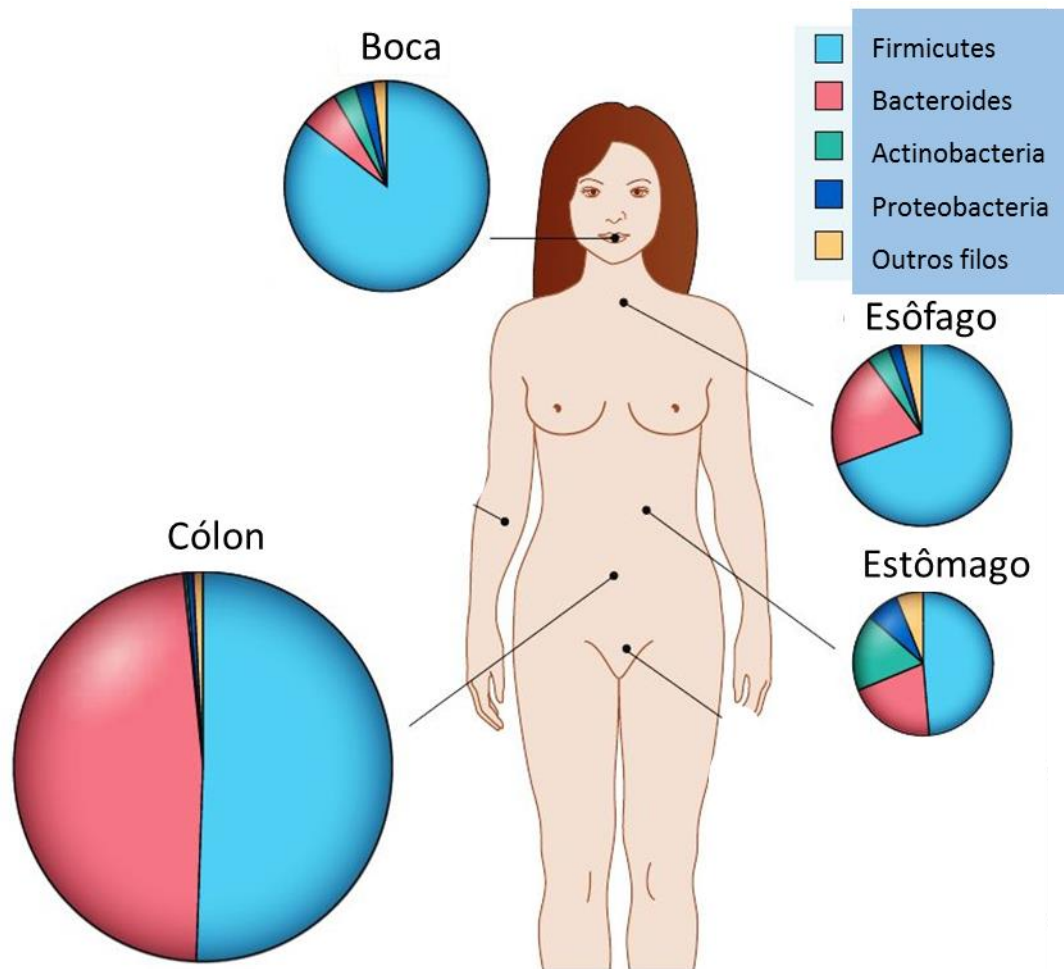


Figura 4: Representação da microbiota por filo em diferentes segmentos do trato gastrointestinal. O tamanho dos círculos representa a diferença proporcional do número de representantes em cada segmento. Dethlefsen *et al.*, 2007.

O filo Firmicutes é a divisão mais numerosa e diversa encontrada no intestino (Guarner, 2012). É composto por bactérias Gram-positivo com baixo conteúdo G/C, principalmente representado por espécies da classe Clostridia em humanos, e pelo gênero *Lactobacillus* em camundongos. O filo Bacteroidetes, o segundo mais numeroso, é composto por bactérias Gram-negativo representado por várias espécies de *Bacteroides*, incluindo *Bacteroides thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. fragilis* e *B. ovatus* (Eckburg *et al.*, 2005). Já as bactérias da divisão Actinobacteria são Gram-positivo e apresentam

organização filamentosa e muito ramificada. Espécies do gênero *Bifidobacterium* são comumente encontradas colonizando o colón de humanos e camundongos (Guarner, 2012). O filo Proteobacteria é formado por bactérias Gram-negativo. A família Enterobacteriaceae representada pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, dentre outros, pertence ao grupo Gamma-Proteobacteria e são subdominantes na microbiota, entretanto o aumento no número de representantes desse grupo conhecidamente está associado com diversas doenças inflamatórias intestinais (Winter *et al.*, 2013; Winter & Bäumlér, 2014).

Embora a microbiota dos mamíferos seja composta majoritariamente por apenas quatro filos existe uma combinação particular de predominância de espécies em um indivíduo que é distinto da encontrada em outro (Guarner, 2012). Há uma considerável variação na composição da microbiota presente nas fezes de diferentes indivíduos (diversidade interindividual) (Eckburg *et al.*, 2005). Em relação ao tempo, estudos têm demonstrado que a microbiota é bastante estável (estabilidade intraindividual) (Ley *et al.*, 2006b). Essa estabilidade é adquirida após os 2 anos de vida, em humanos, quando a colonização intestinal atinge seu clímax (Guarner, 2012). Podem existir flutuações transitórias na composição da microbiota do indivíduo sob certas circunstâncias, como durante doenças diarreicas agudas, terapia antibiótica ou intervenções dietéticas, mas a microbiota tende a voltar a sua composição típica (Ley *et al.*, 2006b). Esse fenômeno é chamado de resiliência (Guarner, 2012).

A colonização bacteriana intestinal é essencial para muitos dos processos fisiológicos, tais como, construção da barreira epitelial intestinal, desenvolvimento da motilidade intestinal e aquisição de nutrientes, defesa contra patógenos e desenvolvimento do sistema imune (Lupp *et al.*, 2007). O desenvolvimento da ultraestrutura intestinal está intimamente ligado a microbiota (Guarner, 2012). Animais isentos de germes apresentam várias alterações morfológicas, como modificação na formação dos microvilos nos

enterócitos, redução da taxa de renovação das células epiteliais e diminuição na expressão de defencinas e outras proteínas antimicrobianas (Servin, 2004; Abrams *et al.*, 2013). Além disso, a microbiota contribui para a aquisição de nutrientes pelo hospedeiro por aumentar a eficiência digestiva de polissacarídeos e sintetizar a vitamina K (Gill *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2010). A presença da microbiota é um importante fator de resistência à colonização e crescimento de microrganismos patogênicos. Isso ocorre devido a competição entre esses microrganismos por espaço, nutrientes (Hooper *et al.*, 2001) e receptores de adesão (Servin & Coconnier, 2003). Além disso, a microbiota produz vários metabólitos inibidores de crescimento e modula a produção e ação de toxinas de microrganismos patogênicos (Alakomi *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001; Servin, 2004).

A capacidade do hospedeiro de tolerar a microbiota indígena e ainda assim montar uma resposta inflamatória contra microrganismos patogênicos têm sido alvo de vários trabalhos nos últimos anos (Souza *et al.*, 2004; Lupp *et al.*, 2007; Medzhitov, 2008). A tolerância a microbiota é mediada por múltiplos fatores, e envolve mecanismos que incluem desde mínima exposição até reconhecimento imune da microbiota indígena e inibição da resposta imune através de mecanismos intra e intercelulares (Abraham & Medzhitov, 2011). A exposição à microbiota, no intestino, é minimizada pela produção de muco pelas células caliciformes, localização baso-lateral de receptores de reconhecimento de patógenos (PRR), secreção de IgA e posicionamento estratégico de células imunes (Van der Sluis *et al.*, 2006; Macpherson *et al.*, 2008), dentre outros. Além disso, o reconhecimento de microrganismos simbióticos promove a ativação de vias anti-inflamatórias na placa de Peyer e na lâmina própria intestinal, com aumento da síntese de IL-10, TGF- β , ácido retinoico e da população de células T reguladoras (Abraham & Medzhitov, 2011; Grainger *et al.*, 2013).

Por outro lado, o contato com os antígenos microbianos é essencial para o desenvolvimento e a maturação do sistema imune do hospedeiro (Neutra *et al.*, 1999; Sansonetti, 2004; Artis, 2008). O desenvolvimento dos tecidos linfoides associados ao intestino (GALTs), a secreção de IgA e a ativação de células T na mucosa intestinal são dependentes de estímulos derivados da microbiota (Hooper & Macpherson 2010). Em animais isentos de germes (GF) é observada alteração na estrutura das placas de Peyer e na população de células T e B na lâmina própria (Servin, 2004). É observado menor desenvolvimento das zonas de células T e B no baço e nos nódulos linfoides dos animais GF (Smith *et al.*, 2007). A colonização intestinal também estimula a produção de IgG e IgA, a diferenciação das células Th1, Th2 e Th17 e T reguladoras (Smith *et al.*, 2007; Round & Mazmanian 2009; Lee *et al.*, 2010). Além disso, sinais oriundos da microbiota indígena estimulam monócitos a produzirem prostaglandina E₂ que regula a produção de mediadores inflamatórios em neutrófilos (Grainger *et al.*, 2013). Em conjunto, a microbiota modula o balanço entre o papel efetor e regulador do sistema imune inato e adaptativo.

A microbiota ativa respostas homeostáticas via receptores do sistema imune presentes nas células epiteliais, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B que permitem a coexistência com produtos microbianos potencialmente tóxicos (Strober *et al.* 2007; Clavel & Haller, 2007). O reconhecimento microbiano é dependente de receptores de reconhecimento a patógenos (PPR), incluindo os receptores do tipo toll (TLRs), do tipo NOD e do tipo lecitina C (CLRs) (Sukhithasri *et al.*, 2013; Arpaia & Barton, 2013; Abraham & Medzhitov 2011; Sartor, 2008). Esses receptores reconhecem padrões moleculares conservados associados a microrganismos (MAMPS). Um dos mais bem caracterizados ligantes de TLR é o lipopolissacarídeo (LPS, endotoxina) derivado da membrana externa de bactérias Gram-negativo (Bode *et al.*, 2012). O LPS é reconhecido pelo TLR4, e desencadeia intensa resposta inflamatória (Bode *et al.*, 2012). A ativação dos

PPRs culmina na indução de uma cascata central de sinalização que inclui o fator nuclear- κ B (NF- κ B), AKT/fosfatidilinositol-3-quinase e de proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Essas vias podem ser inibidas pela indução de moléculas inibidoras como PPAR γ , IFN α/β , IL-10, TGF- β , eicosanoides e inibidores de NF- κ B (Fukata *et al.*, 2006; Neish *et al.*, 2000).

A resposta inflamatória é importante para vários processos fisiológicos, bem como patológicos. A capacidade de montar uma resposta inflamatória apropriada é fundamental para a defesa do hospedeiro contra estímulos infecciosos (Medzhitov, 2007). Essa resposta, resumidamente, envolve a produção de mediadores inflamatórios, a ativação leucocitária e seu recrutamento para o sítio da infecção, bem como o processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos. Na ausência de inflamação, a exposição ao agente infeccioso pode ser fatal (Fagundes *et al.*, 2012). Por outro lado, a inflamação excessiva ou descontrolada também pode causar a morte do hospedeiro após a infecção ou após estímulo inflamatório estéril (Libby & Aikawa, 2002; Weiner & Selkoe 2002; Vilcek & Feldman, 2004; Souza *et al.*, 2004).

Nosso grupo tem desenvolvido alguns estudos que buscam entender a correlação entre a microbiota e a resposta inflamatória com intuito de entender o papel da microbiota na habilidade do hospedeiro de montar uma resposta inflamatória (Souza *et al.*, 2004; 2007; Amaral *et al.*, 2008; Maslowski *et al.*, 2009; Fagundes *et al.*, 2012). Animais isentos de germes constituem uma importante ferramenta para investigação dessa correlação. A isquemia e reperfusão intestinal constitui um modelo de inflamação intensa e aguda (Souza *et al.*, 2004; 2007; Fagundes *et al.*, 2012). A reperfusão de tecidos isquemiados está associado com massiva resposta inflamatória local caracterizada por ativação e recrutamento de leucócitos, disfunção da barreira endotelial nas vênulas pós-capilares e aumento intenso da produção de mediadores inflamatórios (Granger, 1999). Além disso, a

reperfusão também causa inflamação remota (principalmente no pulmão) e sistêmica (Souza *et al.*, 2004). Esse quadro promove lesão tecidual e pode resultar na morte do animal. Interessantemente, os animais GF submetidos a isquemia e reperfusão não apresentam resposta inflamatória local, remota ou sistêmica e nem letalidade após a reperfusão (Souza *et al.*, 2004). Embora os animais GF não tenham apresentado inflamação local e sistêmica, eles foram capazes de responder ao estímulo de isquemia e reperfusão, observado pelo expressivo aumento da produção de IL-10 nesse grupo (Souza *et al.*, 2004). Interessantemente, o fenótipo protetor dos animais GF foi revertido após o tratamento com anti-IL-10 administrado antes da reperfusão da artéria isquemiada, com aumento de TNF α local e sistêmico. Esse dado demonstra que na ausência da microbiota a resposta inflamatória é alterada devido ao aumento da produção de IL-10 após isquemia/reperfusão. Esse aumento de IL-10 previne a produção de mediadores pró-inflamatórios. De fato, a administração de IL-10 recombinante aos animais convencionais antes da reperfusão resultou em diminuição da resposta inflamatória local e sistêmica (Souza *et al.*, 2004).

Nosso grupo observou que a produção de IL-10 nos animais GF está associada a secreção de lipoxina A4 (LXA4) e anexina 1 (ANXA-1) (Souza *et al.*, 2007). Tanto a LXA4 quanto a ANXA-1 apresentam ações anti-inflamatórias em vários modelos de inflamação aguda e crônica (Serhan 2010; Perretti & D'acquistio, 2009). O bloqueio da síntese de LXA4 com um inibidor da 5-lipoxigenase ou anticorpo anti-ANXA-1 preveniram parcialmente o aumento de IL-10 nos animais GF após submissão a isquemia e reperfusão intestinal (Souza *et al.*, 2007). Esses dados sugerem que a secreção de IL-10 nos animais GF é secundária a produção de LXA4 e ANXA-1.

A hiporresponsividade inflamatória observada nos animais GF não foi restrita ao modelo de isquemia e reperfusão. Resultados similares foram encontrados após a administração de LPS: pequena produção de TNF α e resistência a letalidade induzida pelo

LPS (Souza *et al.*, 2004; Fagundes *et al.*, 2012). Entretanto, essa hiporresponsividade resultou na morte dos camundongos isentos de germes após infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*. Esse aumento da letalidade pode ser atribuído a uma falência no recrutamento de neutrófilos devido à incapacidade de produzir mediadores pró-inflamatórios. Essa falência resultou em uma intensa proliferação do microrganismo no parênquima pulmonar com bacteremia sistêmica secundária (Fagundes *et al.*, 2012). Dados semelhantes também foram obtidos em trabalhos conduzidos com infecção por *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Listeria monocytogenes* (Oliveira *et al.*, 2005; Duarte *et al.*, 2004; dos Santos *et al.*, 2011).

Em outro trabalho do nosso grupo foi observado que a microbiota é fundamental para o desenvolvimento de hipernocicepção inflamatória (Amaral *et al.*, 2008). A percepção do estímulo nocivo induzido por carragenina, LPS ou formalina foi atenuada nos animais GF. Entretanto, quando foram administrados os agentes finais da hipernocicepção, como prostaglandina ou dopamina, essa hiporresponsividade não foi manifestada (Amaral *et al.*, 2008). Esses dados indicam que os animais isentos de germes respondem aos mediadores da nocicepção, mas não aumentam a produção de mediadores pró-inflamatórios após estímulo. Além disso, como ocorre após isquemia e reperfusão intestinal ou administração de LPS, a hiporresponsividade inflamatória é revertida pelo tratamento com anti-IL-10 (Amaral *et al.*, 2008).

Além da elevada quantidade de anexina 1, animais isentos de germes ou convencionais tratados com coquetel de antibióticos para depleção da microbiota apresentam elevados níveis de corticosteroide plasmática basal (Mukherji *et al.*, 2013). Mukherji e colaboradores (2013) demonstraram que a microbiota inibe a produção de corticosterona pelas células epiteliais do intestino. Além disso, sob estresse, animais GF respondem secretando maior quantidade de corticosterona que os animais convencionais

(Sudo *et al.*, 2004). A corticosterona é um dos principais glicocorticoides (GCs) presente no plasma de camundongos, hormônio esteroide derivado de colesterol, com importante ação anti-inflamatória e imunossupressora (Zen *et al.*, 2011; Perretti & D'acquistio, 2009). Embora os GCs sejam amplamente utilizados na clínica, sua função e mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados. A maioria dos efeitos dos glicocorticoides é dependente da interação com o receptor para glicocorticoide, um fator de transcrição ativado por ligante (Vandevyver *et al.*, 2013; Perretti & D'acquistio, 2009). Os efeitos biológicos da interação dos glicocorticoides com seu receptor têm sido investigados, visando conhecer as vias envolvidas no processo inflamatório e reguladas por esses hormônios. Atualmente, os efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides são atribuídos a ações inibitórias sobre células imunocompetentes, principalmente linfócitos T, e sobre síntese de citocinas (Lowenberg *et al.*, 2006). Os glicocorticoides também podem estimular ou inibir a atividade de macrófagos de forma concentração dependente (Zhou *et al.*, 2010), além de reduzir o número de basófilos (Meagher *et al.*, 1996), bem como a atividade de apresentação de antígenos das células dendríticas (Vanderheyde *et al.*, 1999) e a apoptose de neutrófilos (Zizzo & Cohen, 2013) e eosinófilos (Baiula *et al.*, 2012). Esses efeitos anti-inflamatórios dos GCs são mediados pela inibição de múltiplos genes inflamatórios (codificação de citocinas, moléculas de adesão, receptores e proteínas), além disso os GCs podem também induzir a expressão de proteínas anti-inflamatórias, como a anexina 1, e assim exercer efeitos pós-genômicos (Barnes, 2006; Clark, 2007). A síntese e secreção de IL-10 também podem ser estimuladas pelos glicocorticoides (Zen *et al.*, 2011).

A hiporresponsividade inflamatória observada nos animais GF é revertida após reposição da microbiota. Em animais isentos de germes, 14 e 21 dias depois de colonizados com a microbiota total, a reperusão do órgão isquemiado resultou em aumento da permeabilidade vascular, influxo de neutrófilos e produção local de TNF α (Souza *et al.*

2004). A convencionalização dos animais GF também restaurou a capacidade de controlar a replicação da *K. pneumoniae* e conter a infecção (Fagundes *et al.*, 2012).

Como exposto anteriormente, a capacidade de responder a um estímulo inflamatório, estéril ou infeccioso, está associada com a relação ecológica de comensalismo/mutualismo existente entre o hospedeiro e a microbiota (Souza *et al.*, 2004; Fagundes *et al.*, 2012). Na ausência da microbiota, ocorre aumento dos níveis basais de corticosterona no plasma e um estímulo inflamatório pode induzir a produção de moléculas anti-inflamatórias, como anexina 1, lipoxina A4 e IL-10, dentre outros. Entretanto, quando a relação microrganismo/hospedeiro é estabelecida de forma total ou parcial, como visto em animais convencionais ou animais isentos de germes com reposição de microbiota total ou pré-estimulados com LPS, existe uma modificação no fenótipo do hospedeiro e este passa a responder a um estímulo inflamatório com produção de agentes pró-inflamatórios, como TNF α e CXCL1 (Souza *et al.*, 2004, 2007).

A presença da microbiota indígena está relacionada a resposta imune tolerante e a vários benefícios para o hospedeiro (Figura 5), entretanto a disbiose da mesma promove a desregulação do sistema imune o que pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias intestinais (IBDs) (Elinav *et al.*, 2011; Maslowski *et al.* 2009; Brown *et al.*, 2013), inflamação aguda após isquemia e reperfusão (Souza *et al.*, 2004) e mucosite (van Vliet *et al.*, 2010; Stringer *et al.*, 2007; Takasuna *et al.*, 1996).

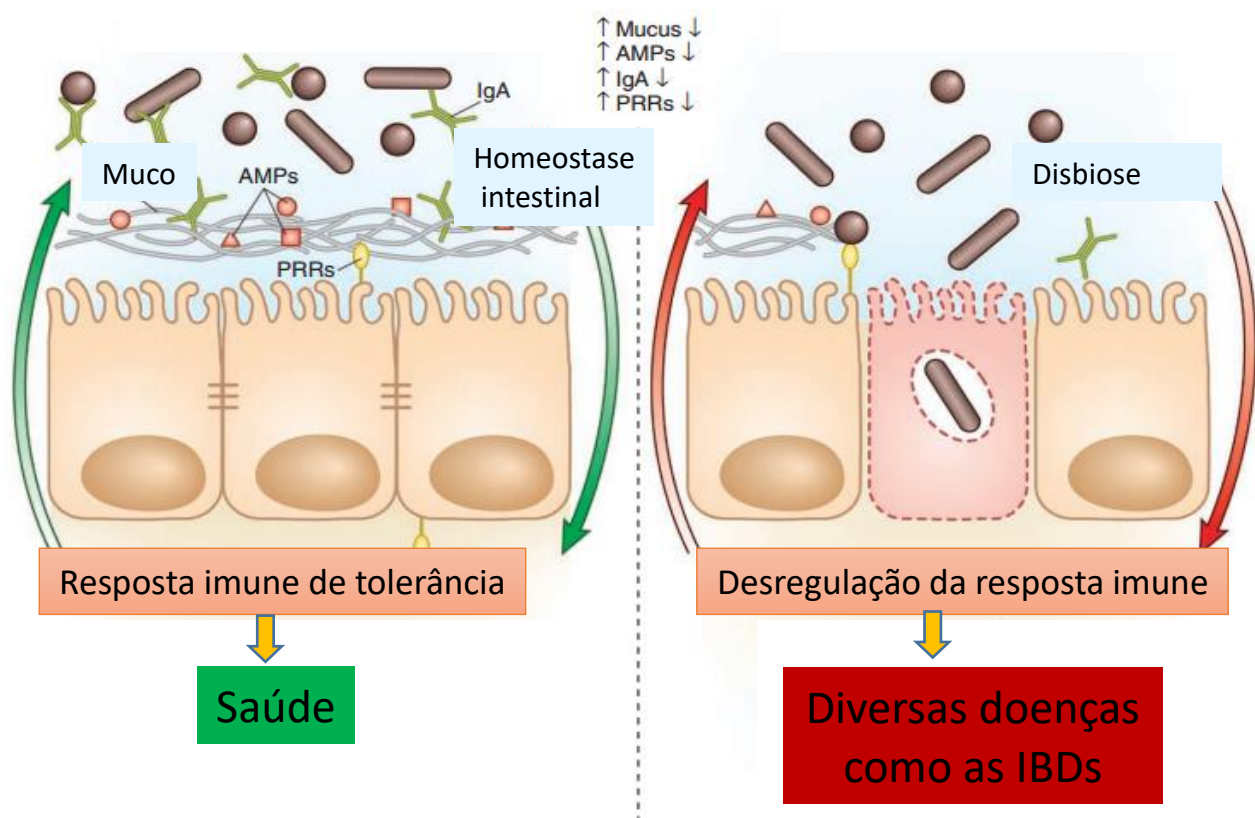


Figura 5: A microbiota indígena induz resposta imune tolerante e confere vários benefícios para o hospedeiro. Por outro lado, a disbiose da mesma promove a desregulação do sistema imune e pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias intestinais (IBDs). Modificado de Brown *et al.*, 2013.

2.5 Microbiota e mucosite

A microbiota intestinal e sua influência no mucosite gastrointestinal estão se tornando um campo proeminente de pesquisa. Estudos prévios têm demonstrado que a microbiota pode estar envolvida no desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterápicos, como o 5-FU (Stringer *et al.*, 2009b; von Bültzingslöwen *et al.*, 2003; Savva-Bordalo *et al.*, 2010). A microbiota tem potencial para influenciar várias etapas envolvidas na patogênese da mucosite, como na resposta inflamatória e produção de ROS, na permeabilidade intestinal, na composição da camada de muco, na resistência a estímulos

prejudiciais e no mecanismo de reparo das células epiteliais e ativação e liberação de moléculas imunes efetoras. Entretanto ainda não se sabe com clareza se a microbiota possui efeitos benéficos no desenvolvimento da mucosite intestinal (van Vliet *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado que ambos, a quimioterapia e o uso profilático de antibióticos durante os tratamentos antineoplásicos, promovem alterações na composição da microbiota (Edlund, 2000; Stringer *et al.*, 2009b; van Vliet *et al.*, 2009) levando ao quadro de disbiose. Embora os grupos bacterianos alterados sejam diversos, a disbiose presente durante os tratamentos antineoplásicos tem em comum a diminuição da diversidade de espécies bacterianas (Touchefeu *et al.*, 2014).

O 5-FU é capaz de promover alterações na composição da microbiota gastrointestinal (Stringer *et al.*, 2009b; von Bültzingslöwen *et al.*, 2003), o que pode contribuir para algumas das morbidades típicas da mucosite, bem como para a resposta imune do hospedeiro. Stringer e colaboradores (2009b) demonstraram que algumas bactérias da microbiota responsáveis pela manutenção do microecossistema intestinal apresentam diferença na susceptibilidade ao quimioterápico 5-FU. Após administração de 5-FU, foi observado diminuição no número de *Clostridium spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.* e aumento de *Escherichia spp.*, no jejuno. No cólon, a administração de 5-FU diminuiu *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.* e *Streptococcus spp.* (Stringer *et al.*, 2009b). Essa diferença de susceptibilidade e a alteração na composição da microbiota podem favorecer a proliferação de bactérias oportunistas e aumentar o dano tecidual, ou ainda, exacerbar a resposta inflamatória.

Em outro estudo, a microbiota oral e intestinal foram alteradas em ratos tratados com 5-FU durante 6 dias (von Bültzingslöwen *et al.*, 2003). A administração de 5-FU causou aumento no número de bactérias facultativas e anaeróbias estritas na cavidade oral e de anaeróbias facultativas no intestino grosso. No intestino delgado não foi observado

alteração no número total de bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas, entretanto foi observado mudança no tipo de facultativos dominantes de cocos Gram-positivo para bastonetes Gram-negativo (von Bültzingslöwen *et al.*, 2003). Além do 5-FU, o tratamento com outros quimioterápicos, como o irinotecano, também podem alterar a composição da microbiota e provavelmente contribuir para algumas das manifestações da mucosite, como a diarreia (Stringer *et al.*, 2009). O tratamento concomitante de 5-FU e irinotecano, em ratos, foi associado à drástica alteração na composição da microbiota com aumento de *Escherichia spp.*, *Clostridium spp.* e *Enterococcus spp.* (Lin *et al.*, 2012). Essas bactérias são comumente isoladas em pacientes com câncer (Montassier *et al.*, 2013).

Ambos, quimioterapia e radioterapia podem aumentar a permeabilidade intestinal (Russo *et al.*, 2013; Nejdfors *et al.*, 2000; Melichar & Zezulova 2011), em parte devido a apoptose de células na cripta e atrofia do vilos (Keefe *et al.*, 2000). Além disso, a microbiota indígena regula a barreira intestinal através da modulação da expressão e distribuição das proteínas de junções (Ulluwishewa *et al.*, 2011). Sendo assim, a alteração na composição da microbiota durante os tratamentos antineoplásicos pode contribuir para alteração da permeabilidade intestinal. A camada de muco epitelial é outro importante fator protetor que contribui para a integridade intestinal e é regulada pelas bactérias intestinais (Guarner, 2012).

Tanto a alteração da camada de muco intestinal quanto o aumento da permeabilidade intestinal, além da ulceração da camada epitelial, podem contribuir para translocação bacteriana durante a mucosite, do lúmen intestinal e para o tecido adjacente e para o sangue, podendo resultar em bacteremia e sepse. Essa translocação exacerba a resposta inflamatória e amplifica o dano à mucosa intestinal induzido pelo quimioterápico (Soni, 2004; Brandi *et al.*, 2006). Brandi e colaboradores (2006) demonstraram que camundongos isentos de germes são mais resistentes a indução de mucosite, necessitando

de altas doses do quimioterápico Irinotecano para desenvolverem a doença. Entretanto, nesse trabalho foi demonstrado apenas que os animais isentos de germes necessitam de aproximadamente o dobro de quimioterápico para desenvolverem lesão intestinal e diarreia tardia (Brandi *et al.*, 2006).

Embora, como exposto, há relatos de que a microbiota é alterada após tratamento com o quimioterápico 5-FU, ainda não se sabe qual a importância da microbiota para desenvolvimento da patogênese da mucosite intestinal em camundongos.

1. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Esse projeto tem como **objetivo principal** avaliar o **papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal** induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) em camundongos.

3.2 Objetivos específicos:

- 1) Padronizar o modelo de mucosite induzido pelo quimioterápico 5-FU em camundongos convencionais mediante a análise dos seguintes parâmetros:
 - 1.1 Definição da dose do quimioterápico mais eficiente em induzir a mucosite e do tempo de eutanásia.
 - 1.2 Avaliação da ação antineoplásica da droga por meio da contagem total de leucócitos no sangue.
 - 1.3 Análise da consistência das fezes, bem como, presença de sangue oculto, perda de peso, comprimento do intestino e avaliação histopatológica do intestino.
 - 1.4 Avaliação da inflamação, por meio da análise do acúmulo de neutrófilos e eosinófilos e da concentração de citocinas pró-inflamatórias no intestino.
- 2) Avaliar o papel da microbiota no desenvolvimento das lesões intestinais induzida pelo 5-FU.
 - 2.1 Analisar o fenótipo de camundongos isentos de germes após tratamento com o quimioterápico. Para isso animais axênicos ou tratados desde o nascimento com coquetel de antibióticos para prevenção da colonização pela microbiota receberam o 5-FU e os mesmos parâmetros citados no item 1 foram avaliados.

- 2.2 Avaliar se a depleção da microbiota de camundongos convencionais adultos pelo coquetel de antibióticos interfere no desenvolvimento da mucosite. Animais convencionais adultos foram tratados com coquetel de antibióticos para depleção da microbiota. Após esterilização, os camundongos foram tratados com o 5-FU e os mesmos parâmetros citados no item 1 foram avaliados.
- 2.3 Verificar se a reposição da microbiota nos animais isentos de germes reverte o fenótipo observado na ausência da mesma após tratamento com o 5-FU. Para isso camundongos isentos de germes receberam fezes dos animais convencionais, por via oral. Após a colonização pela microbiota, a mucosite foi induzida e os parâmetros citados no item 1 foram avaliados.
- 2.4 Analisar a composição da microbiota após tratamento com o quimioterápico 5-FU. Para isso, as fezes foram retiradas em condições estéreis e processadas para análise do perfil microbiano por PCR e ainda cultivadas em meios sólidos seletivos e enriquecidos.
- 2.5 Avaliar se a alteração da microbiota após tratamento como o quimioterápico contribui para o desenvolvimento da mucosite. Para isso, camundongos convencionais foram tratados com antibióticos seletivos para determinados grupos bacterianos durante tratamento com o quimioterápico e os parâmetros citados no item 1 foram avaliados.
- 3) Verificar se a colonização específica altera a resposta dos animais isentos de germes tratados com o quimioterápico 5-FU. Para isso, animais isentos de germes foram monocolonizados com *Escherichia coli* ou *Bacteroides fragilis*. Após a monocolonização, foi administrado o 5-FU a esses animais e o fenótipo avaliado.
- 4) Verificar participação de glicocorticoides na resposta observada nos animais isentos de germes e monocolonizados com *Escherichia coli* ou *Bacteroides fragilis* submetidos ao

tratamento com o 5-FU. Para isso, animais isentos de germes foram tratados com antagonista do receptor de glicocorticoide (RU486) durante indução da mucosite pelo quimioterápico 5-FU. A concentração de corticosterona foi dosada no plasma de animais convencionais, isentos de germes e monocolonizados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados: (I) camundongos convencionais Swiss com 6-8 semanas oriundos do centro de bioterismo (Cebio) da Universidade Federal de Minas Gerais; (II) camundongos Swiss isentos de germes (GF) com 6-8 semanas derivados de matrizes axênicas, propagados no biotério de Gnotobiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG; (III) camundongos isentos de germes foram convencionalizados através da administração oral das fezes de camundongos convencionais, e mantidos no Laboratório de Interação Microrganismos Hospedeiros e utilizados com 6-8 semanas.

Animais GF foram transferidos para microisoladores (Alesco) e mantidos em condições estéreis no biotério do Laboratório de Interação Microrganismos Hospedeiros do ICB/UFMG até os procedimentos. O manejo de animais foi feito em fluxo laminar, obedecendo às normas de ética em experimentação animal. Para o presente estudo, os camundongos receberam ração (Nuvilab nuvital, Curitiba, PR) e água esterilizadas por calor úmido, *ad libitum*. Para testar a viabilidade de uso dos camundongos isentos de germes, amostras de fezes foram cultivadas periodicamente e inoculadas nos meios de cultura líquidos de tioglicolato e BHI (*brain heart infusion*).

Todos os procedimentos experimentais deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG-CEUA no protocolo de acesso 322 / 2012.

4.2 Drogas

Foi utilizado o quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) (Fauldfluor), nas concentrações de 50, 150 e 450 mg/kg. Foram utilizados os antibióticos Ampicilina, Neomicina, Metronidazol, Vancomicina e Ciprofloxacino e o antifúngico Nistatina, todos de uso comercial. Foram utilizados o glicocorticoide sintético dexametasona (Decadron/Àche) na concentração de 10 mg/kg e o inibidor do receptor de glicocorticoide RU486 (Tocris) na concentração de 20 mg/kg.

4.3 Indução de mucosite intestinal experimental

A dose do quimioterápico foi definida através de um experimento de dose resposta. Para isso, camundongos receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de 5-fluorouracil, durante 3 dias consecutivos. Foram utilizadas as doses de 50, 150 e 450 mg/kg do quimioterápico. Os animais controles receberam PBS. Os camundongos foram pesados diariamente. Decorridas 24 horas após a última administração do quimioterápico, os animais foram eutanasiados por exsanguinação e os tecidos e sangue removidos para análises posteriores.

A dose escolhida (450 mg/kg) foi usada para a avaliação da sobrevivência dos animais e da condição clínica, para definição do período de eutanásia que ficou estabelecido com sendo 48h após a última injeção do quimioterápico. A dose de 450 mg/kg foi usada para todos os demais experimentos.

4.4 Avaliação do comprimento do intestino e graduação clínica da doença

O intestino delgado foi removido e o seu comprimento, distância entre o piloro gastroduodenal e o óstio ileal, foi determinada com auxílio de uma régua. Após essas medidas, o intestino foi dividido em três partes iguais. As análises iniciais foram feitas nos

três segmentos. Posteriormente, a porção proximal do intestino foi utilizada para as análises enzimáticas e histológicas e a distal para o ensaio de PCR em tempo real.

A graduação clínica da doença foi adaptada e modificada para o nosso modelo (Maslowski et al., 2009). Foi avaliado a consistência e a presença de sangue oculto nas fezes, bem como sinais de morbidade, como pelo arrependido, postura arqueada, diminuição da mobilidade dentro da caixa.

4.5 Histologia

Amostras dos três segmentos intestinais foram removidas e fixados em formol 10% tamponado. O tecido foi desidratado gradualmente em etanol, embebido em parafina, cortado, fixado em lâminas histológicas e corados com H&E. A análise histopatológica foi feita após exame das lâminas ao microscópio. A altura das vilosidades da mucosa de cada amostra foi medida utilizando imagens digitalizadas obtidas com a objetiva de 10X a partir de um microscópio de luz (Olympus) adaptado com uma câmera digital. A avaliação histopatológica foi baseada na intensidade do infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria, nas mudanças na arquitetura da mucosa, diminuição da altura das vilosidades intestinais, edema, hemorragia. Para cada parâmetro as alterações foram classificadas de acordo com a seguinte escala: ausente (0), leve (1), moderada (2), intenso (3) e muito intenso (4). O número representará o escore patológico de 0 a 15. Os resultados foram expressos como valores médios de \pm SEM para cada grupo experimental (adaptado de Usselman *et al.*, 2001 e Ostanin *et al.*, 2009).

4.6 Contagem total de leucócitos

Para contagem total de leucócitos circulantes foi coletado 10 μ L de sangue de cada animal e acrescentado 90 μ L do corante Turkey. As células foram contadas em câmara Newbauer em microscópio de luz.

4.7 Análise do índice de hematócrito

Uma amostra de sangue de cada animal foi coletada por meio de um tubo capilar de vidro para determinação de micro-hematócrito (Perfecta), o qual foi centrifugado em uma centrífuga de micro-hematócrito por 10 minutos (Centrifuge hematocrit HT). Em seguida, foi realizada uma proporção entre o comprimento das porções vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma regra de três simples.

4.8 Ensaio de MPO para quantificação de influxo de neutrófilos

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no intestino foi utilizado o método de quantificação da atividade de mieloperoxidase. Fragmentos de intestino foram pesados e suspensos em salina EDTA, submetido à homogeneização e centrifugação (3000g, 15 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em solução salina/EDTA (1 mL) gelada, sendo adicionados NaCl 0.2% gelada e NaCl 1.6% com glicose 5% gelada na mesma quantidade. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em tampão fosfato com HTAB a 5% e homogeneizado por 30 segundos. As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido seguidamente, centrifugadas e o sobrenadante coletado para ensaio de MPO. Amostras de intestino foram diluídas antes do ensaio. A atividade de mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de

leitor de ELISA (450 nm) usando tetramethylbenzidine (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM). Os resultados foram expressos como unidades relativas (MPO) da O.D. do sobrenadante do tecido com neutrófilos do peritônio de ratos processados da mesma maneira. Para este fim, neutrófilos foram induzidos no peritônio de ratos por injeção de 3 mL de caseína 5%. A curva padrão do número de neutrófilos (>95% de neutrófilos) versus O.D. foi obtida pelo processamento de neutrófilos purificados da maneira descrita para o ensaio de atividade de MPO.

4.9 Ensaio de EPO para quantificação de influxo de eosinófilos

O ensaio do EPO, para verificar a presença de eosinófilos, foi feito conforme descrito por Strath & Sanderson, 1985. Resumidamente, para cada 100 mg de intestino foi utilizado 1 ml de PBS para homogeneizar o tecido em seguida foi centrifugado a 3.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e as hemácias foram lisadas por pressão osmótica. As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em 1 ml de 0,5% de brometo de amônio hexadeciltrimetil em PBS. Posteriormente as amostras foram congeladas três vezes em nitrogênio líquido, e centrifugado a 4°C, 3.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado em o ensaio enzimático com a adição de um montante igual substrato (1,5 mmol/L de o-fenilenodiamina) e 6,6 mmol / L de H₂O₂ em 0.075 mmol / L Tris-HCl (pH 8). A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M e lido na absorbância de 492 nm.

4.10 Extração de citocinas do intestino

Fragmentos do intestino (100 mg) foram homogeneizados em 1 mL de solução de extração de citocinas (NaCl 0,4 M; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%;

fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (8 g NaCl, 0,2 g KCl e 2,89 g Na₂HPO₄.12H₂O diluídos em 1 litro). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10 minutos a 10000 g a 4^oC e o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA.

4.11 Determinação da concentração de citocinas por ELISA

As amostras foram diluídas em PBS contendo 0,1% de albumina bovina. A concentração das citocinas analisadas foi determinada utilizando-se anticorpos obtidos da R&D Systems (DuoSet). Para realização do ensaio foram seguidas as instruções do fabricante que estão resumidamente descritas abaixo.

Todos os ensaios foram realizados em placas com 96 poços (Nunc, USA). Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7,4, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4^oC. A placa foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina, em seguida as amostras foram pipetadas na placa. A reação ocorreu durante aproximadamente 18 horas à 4^oC. Os anticorpos de detecção foram diluídos em PBS, pH 7,4, com 0,1% de albumina bovina, sendo que a sensibilização ocorreu durante aproximadamente 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi detectada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase e revelada com OPD (“o-phenyldiamine dihydrochloride”-Sigma) A reação foi interrompida com H₂SO₄ a 1 M.

A leitura foi feita no leitor de ELISA com filtro para um comprimento de onda de 490 nm.

4.12 Avaliação da expressão do mRNA de *il-10* e *anexina 1*

Para a quantificação relativa da expressão do RNAm de *il-10* e *anexina 1*, foram utilizados intestino de animais convencionais e isentos de germes controle e tratados com 5-FU. O RNA total foi extraído com Trizol™ (life technologies) e procedeu-se a extração das amostras com clorofórmio-isopropanol conforme protocolo do fabricante. Para reação da transcriptase reversa, foi utilizado kit da Pharmacia/Biotech para síntese da fita de DNA complementar (cDNA). Com o uso de iniciadores específicos (Tabela 1), o cDNA da *il-10*, da *anexina 1* e da proteína ribossomal L4 (*rpl4*) foram amplificados. Como controle da quantidade de RNA utilizado, foi determinado o nível de expressão de gene *rpl4* de todas as amostras.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores para *il-10*, *anexina 1* e *rpl-4* usados no qPCR.

Grupo alvo	Sense	Anti-sense
<i>il-10</i>	5'TGGATAGCCTTGGCTCTAAC3'	5'CCGCTGTCATTCTTCTACCT3'
<i>anexina 1</i>	5'ACTCTGCGAAGATGAGGAAAG3'	5'AGATGCCAGGGCTTTGTATG3'
<i>rpl-4</i>	5'TCCCTCAAGAGTAACTATAACCTGCCC3'	5'TGGTGCTCGGAGGGCTCTTTG3'

4.13 Depleção da microbiota por coquetel de antibióticos

Uma combinação de um amplo espectro de antibióticos foi utilizada para esterilização do trato gastrointestinal de camundongos adultos e neonatos convencionalizados como previamente descrito na literatura (Fagarasan et al., 2002). Foram utilizados a combinação dos seguintes antibióticos: ampicilina (2g/L), metronidazol (1g/L), ciprofloxacino (0,2g/L), vancomicina (0,5g/L) e neomicina (2g/L) e o antifúngico nistatina (0,12g/L), todos administrado na água de beber por 30 dias para camundongos adultos e 60 dias para os neonatos. A maravalha foi trocada periodicamente e todo o experimento

conduzido em condições de assepsia para prevenir a reinfecção dos camundongos. Para verificar se o tratamento com antibiótico foi adequado para depletar a microbiota, amostras de fezes foram cultivadas em meio tioglicolato várias vezes após início do tratamento com os antibióticos. Após a administração de antibióticos os animais foram tratados com 5-FU. O coquetel de antibióticos foi mantido durante o tratamento com o 5-FU.

4.14 Reposição da microbiota total em animais isentos de germes

Para reposição da microbiota, animais isentos de germes receberam a administração de fezes (via oral) oriundas de animais convencionais de acordo com protocolo previamente descrito por Souza e colaboradores (2004). As fezes, retiradas da região retal de animais convencionais foram homogeneizadas em salina a 10% e administrados um volume de 100 µl por gavagem. As fezes de animais isentos de germes foram retiradas, submetidas ao mesmo protocolo experimental e administrada em outro grupo, que foi utilizado como controle do experimento. Após 30 dias, a colonização pelo microbiota foi verificada em meio tioglicolato e BHI, e esses animais foram submetidos ao protocolo para indução de mucosite descrito anteriormente.

4.15 Avaliação da composição da microbiota intestinal

O DNA total foi extraído do conteúdo do ceco, com Kit para extração de DNA das fezes (Qiagen). A extração das amostras foi feita conforme protocolo do fabricante. A avaliação dos componentes da microbiota, foi realizado por qPCR utilizando-se iniciadores específicos, discriminados na Tabela 2. Os iniciadores foram desenhados para regiões do gene da subunidade 16S do ribossomo bacteriano, de acordo com o táxon.

Tabela 2: Sequência dos iniciadores de rDNA do gene 16S usados no qPCR.

Grupo alvo	Sense	Anti-sense
Bactéria universal	5'ACTCCTACGGGAGGCAGCAG3'	5'ATTACCGCGGCTGCTGGC3'
<i>E.coli</i>	5'CATGCCGCGTGTATGAAGAA3'	5'CGGGTAACGTCAATGAGCAAA3'

Amostras de fezes foram diluídas em salina e cultivadas nos meios sólidos seletivos Macconkey, BBE e MRS para avaliação do número de unidades formadoras de colônias de Enterobactérias, *Bacteroides* e de bactérias ácido lácticas, respectivamente.

4.16 Tratamento com os antibióticos Ciprofloxacino, Metronidazol e Vancomicina

Animais convencionais foram tratados com Ciprofloxacino ou Metronidazol ou Vancomicina (via oral, 50 mg/kg) de 12 em 12 horas durante todo o protocolo de indução da mucosite (4 dias). No 5^o dia foi feita a eutanásia e os tecidos coletados para análises.

4.17 Colonização específica

Animais isentos de germes foram monocolonizados com *E. coli* (ATCC: 25922) ou *B. fragilis* (ATCC: 25285). A administração da linhagem bacteriana foi realizada em fluxo laminar, onde cada animal em microisolador recebeu 100 µL da suspensão de bactérias (10⁸ UFC/animal) via oral por inserção com cânula de gavagem. Após 7 dias, a monocolonização foi verificada através do cultivo do conteúdo fecal em meios de cultura seletivos (Macconkey e BBE) e UFCs foram contadas. A identificação e contagem das unidades formadoras de colônias determinaram a viabilidade das colonizações.

4.18 Modelo de hipernociceção inflamatória induzida por carragenina

Para indução de hipernocicepção inflamatória, a carragenina (100 g/pata em 30 µL de salina) foi injetada na pata traseira direita de camundongos convencionais, isentos de germes e monocolonizados com *E. coli* e *B. fragilis*. A nocicepção foi avaliada antes e 3h após injeção intraplantar de carragenina através do método de von Frey. Os animais foram ambientados 1 hora antes dos testes de nocicepção. O limiar de hipernocicepção foi definido pela subtração do valor nociceptivo inicial do obtido 3 horas após injeção da carragenina. Para avaliação de edema, as patas traseiras direita e esquerda foram pesadas na 3^a hora após injeção da carragenina e o peso da pata direita foi subtraído da esquerda. A concentração da citocina TNF α , MPO foi quantificada na pele intraplantar da pata traseira direita e a esquerda foi utilizada como controle.

4.19 Tratamento com dexametasona e RU486

Animais convencionais foram tratados com dexametasona (via i.p., 10 mg/kg) durante todo o protocolo de indução da mucosite (4 dias). No 5^o dia foi feita a eutanásia e os tecidos coletados para análises.

O RU486 foi ressuspensão em 3% de DMSO e dissolvido em óleo de amendoim (Sigma) e administrado a animais isentos de germes durante todo o protocolo de indução da mucosite (4 dias) 4 horas antes o quimioterápica via subcutânea na dose de 20mg/kg, No 5^o dia foi feita a eutanásia e os tecido coletados para análises.

4.20 Dosagem de corticosterona plasmática

A concentração de corticosterona foi mensurada no plasma dos camundongos usando kit de ELISA (Cayman; USA). O teste foi feito conforme as especificações do fornecedor. As amostras foram diluídas 1:100.

4.21 Análise Estatística

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre os vários grupos foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média±erro padrão médio. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS

5.1 A dose de 450 mg/kg de 5-fluorouracil induziu grave dano intestinal

Para padronização da dose de 5-fluorouracil (5-FU) foi realizado experimento de dose resposta para determinar a dose necessária para induzir mucosite intestinal nos camundongos convencionais. Como demonstrado na figura 6A, todos os animais que receberam as três diferentes doses de 5-FU (50, 150 e 450 mg/kg) durante 3 dias consecutivos apresentaram progressiva perda de peso quando comparados aos animais controles. Entretanto, essa perda foi aproximadamente 10% maior nos animais que receberam 150 e 450 mg/kg de 5-FU quando comparados aos animais que receberam 50 mg/kg no 4^o dia. A ação antiproliferativa do quimioterápico foi avaliada através da contagem de leucócitos presente no sangue. Apenas animais tratados com a dose de 150 e 450 mg/kg do quimioterápico apresentaram leucopenia quando comparados ao grupo controle (Figura 6B). Apenas a maior dose do quimioterápico promoveu encurtamento do intestino quando comparada ao grupo controle (Figura 6C). Foi observado hemoconcentração apenas nos animais tratados com 150 e 450 mg/kg de 5-FU em relação grupo controle (Figura 6D). A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no intestino, indicativa do acúmulo de neutrófilos, foi aumentada em todos os animais tratados com o quimioterápico, independentemente da dose utilizada (Figura 6E).

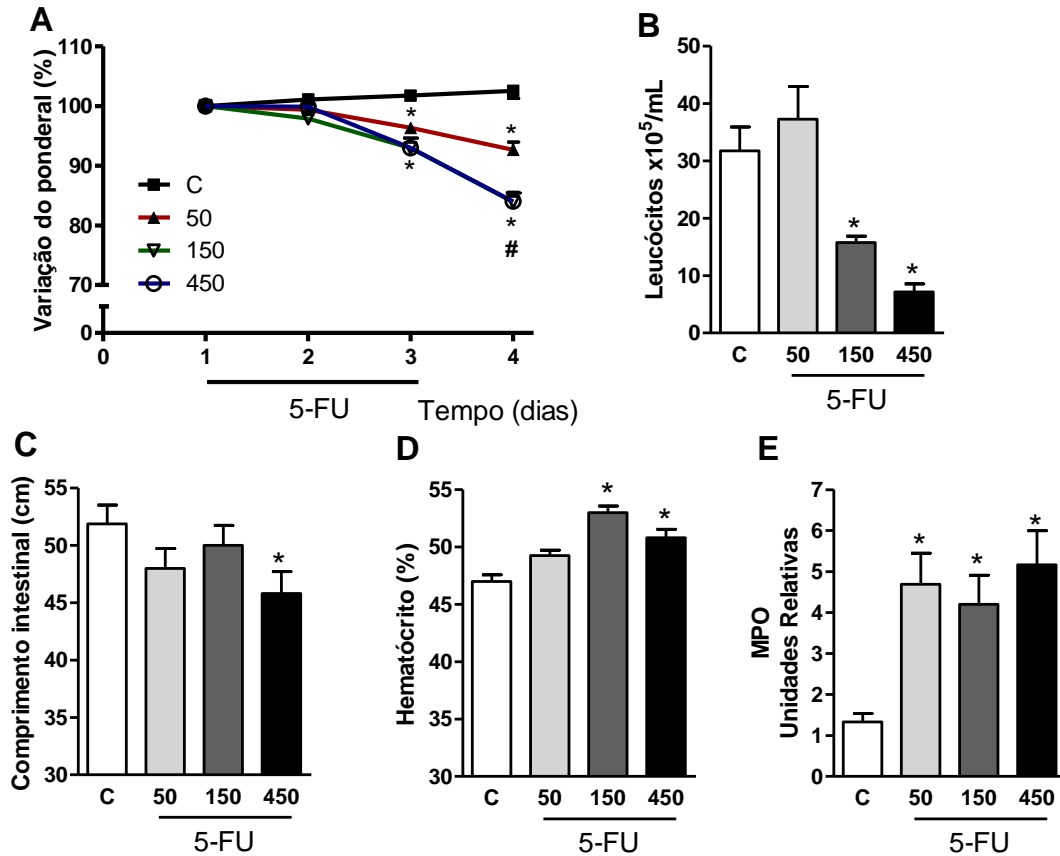


Figura 6: Avaliação do fenótipo de camundongos convencionais submetidos ao teste de dose resposta do quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU). Camundongos convencionais, após receberem 3 doses diárias consecutivas de 5-FU, apresentaram progressiva perda ponderal (A), entretanto nos animais que receberam a dose de 50 mg/kg essa perda foi menos acentuada. A administração das doses 150 e 450 mg/kg de 5-FU promoveu leucopenia em relação ao grupo controle (B). Foi observado encurtamento do comprimento intestinal apenas nos animais que receberam 450 mg/kg do quimioterápico (C). A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi aumentada em todos os grupos que receberam o quimioterápico quando comparados ao grupo controle (E). As barras representam a média \pm erro padrão. $n=3-5$. * $P<0,05$ vs C ou # $P<0,05$ vs 50 mg/kg.

A análise histopatológica intestinal foi realizada para avaliar o efeito do quimioterápico 5-FU no desenvolvimento da mucosite intestinal. A avaliação dos cortes histológicos dos três segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) evidenciou que o 5-FU, nas três doses administradas, promoveu influxo de células inflamatórias para a lâmina própria e submucosa em relação ao grupo controle (Figura 7). Entretanto, os camundongos que receberam a maior dose do quimioterápico (450 mg/kg) (figura 7D) apresentaram alterações mais pronunciadas da arquitetura intestinal, caracterizadas por influxo de células inflamatórias e edema na mucosa e submucosa, redução do comprimento do vilo e do número de glândulas de Lieberbühn (cripta), quando comparados aos animais que receberam as doses de 50 e 150 mg/kg (Figura 7 B e C).

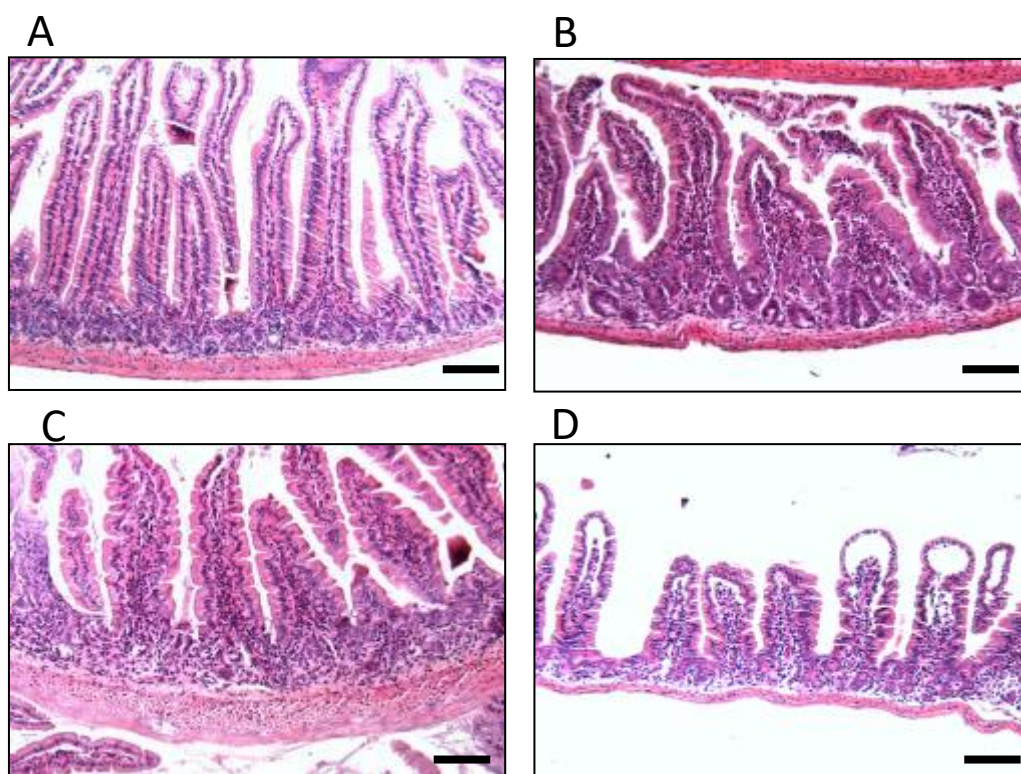


Figura 7: Cortes histológicos do duodeno de camundongos controle e com mucosite. Secção dos animais controles (A) ou que receberam 5-FU nas doses de 50 mg/kg (B), 150 mg/kg (C) e 450 mg/kg (D) durante 3 dias consecutivos, em aumento de 10X. Decorridos

24 horas após última injeção do quimioterápico, os animais foram eutanasiados. As barras representam 100 μm .

A dose de 450 mg/kg foi escolhida para os demais experimentos devidos os efeitos apresentados nos parâmetros acima analisados.

Uma vez determinada a dose do quimioterápico, foi avaliada a curva de sobrevivência dos animais após indução da mucosite. Como demonstrado na figura 8, nos dias 6 e 7 após o início do tratamento, 50% e 100% dos camundongos convencionais morreram, respectivamente.

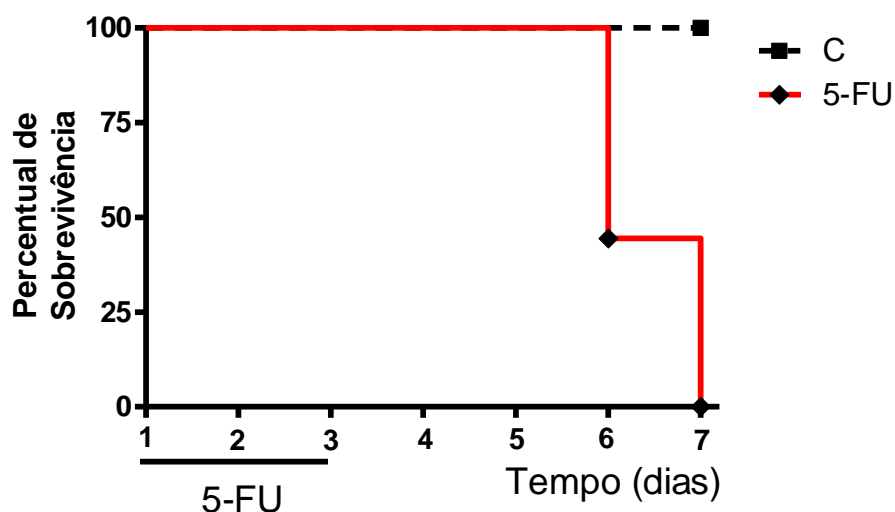


Figura 8: Curva percentual de sobrevivência dos camundongos convencionais após 3 dias de tratamento com 450 mg/kg de 5-FU (n=5).

Dado o resultado da curva de sobrevivência, definiu-se que os demais experimentos seriam realizados 2 dias (48 horas) após a última injeção de 5-FU (dia 5).

5.2 A ausência da microbiota está associada com redução da lesão e da inflamação intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU.

Uma vez definidos a dose do quimioterápico (450 mg/kg) e o tempo de eutanásia (5^o dia), nosso próximo passo foi avaliar o papel da microbiota no desenvolvimento da mucosite. Para isso utilizamos animais isentos de germes axênicos (GF) ou com a microbiota depletada pela administração de um coquetel de antibióticos a camundongos convencionais, tanto neonatos quanto adultos.

A fim de verificar se a ausência da microbiota interferiria na ação do 5-FU, a ação antiproliferativa do quimioterápico foi avaliada através da contagem de leucócitos presente no sangue e na medula. Os animais convencionais tratados com o 5-FU apresentaram redução do número de leucócitos circulantes em relação ao respectivo grupo controle (Figura 9A). Na ausência da microbiota, a administração do quimioterápico também resultou na diminuição do número de leucócitos circulantes quando comparados aos GF controles (Figura 9A). Essa diminuição foi semelhante à observada nos animais CV-5FU. Resultado similar foi observado nas células da medula (dado não mostrado). A administração de 5-FU a animais convencionais promoveu redução do comprimento intestinal quando comparado ao respectivo controle (Figura 9B). Entretanto, não foi observada diferença no comprimento intestinal dos animais GF após tratamento com o 5-FU quando comparados aos GF controles. O comprimento intestinal dos animais GF-5FU foi maior que o dos animais CV-5FU (Figura 9B).

A atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilo (EPO) foi avaliada para inferir o acúmulo de neutrófilos e de eosinófilos no intestino, respectivamente. As atividades da MPO (Figura 9C) e da EPO (Figura 9D) apresentaram-se aumentadas nos animais convencionais tratados com o quimioterápico quando comparados aos animais CV controles. No entanto, nos animais GF não houve diferença estatística na

atividade dessas enzimas entre os animais tratados com o 5-FU e o grupo GF controle. A atividade da MPO e EPO foi menor nos animais GF-5FU quando comparados aos animais convencionais que receberam o quimioterápico. De forma complementar, a concentração das quimiocina CXCL-1 (Figura 9E), quimioatraentes para neutrófilos, estava elevada no intestino dos animais CV tratados com o quimioterápico quando comparados ao grupo controle. A citocina IL-1 β (Figura 9F) também estava aumentada no intestino dos animais CV-5FU após injeção do quimioterápico. A concentração dessas citocinas não foi alterada no intestino dos animais GF após tratamento com o 5-FU. E ainda, quando comparados aos animais CV-5FU, foi observada uma menor concentração de CXCL-1 e IL-1 β no intestino dos camundongos GF após tratamento com 5-FU.

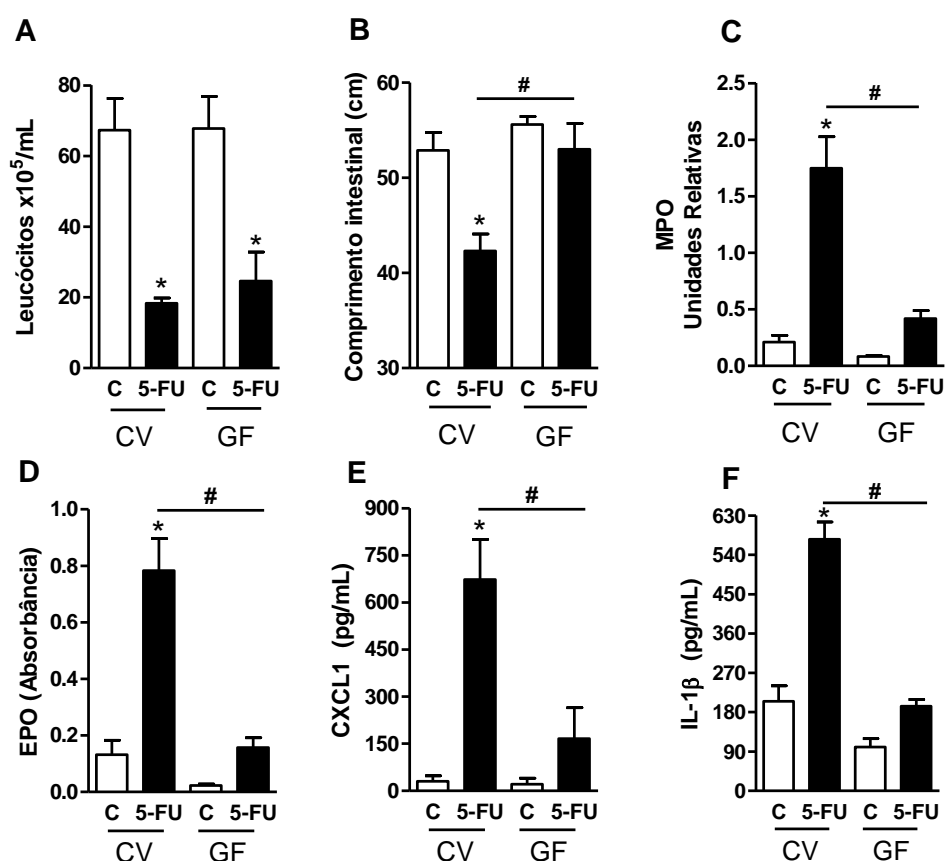


Figura 9: Ausência de microbiota está associada a diminuição da resposta inflamatória após administração do quimioterápico 5-FU. Camundongos convencionais (CV) e isentos

de germes (GF) apresentam leucopenia após tratamento com 5-FU (A). Diferentemente do observado nos animais CV-5FU, o comprimento intestinal dos animais GF-5FU não se alterou quando comparados aos animais GF-C (B). A atividade da MPO (C) e da EPO (D) foi maior nos animais CV-5FU quando comparados aos CV-C e não houve diferença estatística entre os grupos de camundongos GF. A concentração da quimiocina CXCL1 (E) no intestino dos camundongos convencionais (CV) apresentou-se elevada quando comparado ao controle, entretanto não houve diferenças no grupo GF. A citocina IL-1 β (F) estava aumentada apenas nos animais CV-5FU tratamento com o quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU). As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. * P <0,05 vs C ou # P <0,05 vs CV-5FU.

A análise dos cortes histológicos demonstrou que o tratamento com 5-FU promoveu expressivas alterações na arquitetura intestinal dos animais convencionais quando comparados ao grupo controle (Figura 10A e 10B). Nos animais CV-5FU foi observada redução do comprimento dos vilos e do número das glândulas de Lieberkhün (Cripta), intenso influxo de células inflamatórias e edema na mucosa e submucosa, perda de células caliciformes e hemorragia quando comparados ao respectivo controle. Nos cortes histológicos dos animais GF-5FU essas alterações foram atenuadas quando comparados aos CV-5FU (Figura 10C e 10D). A análise quantitativa das alterações histológicas está representada na figura 10E.

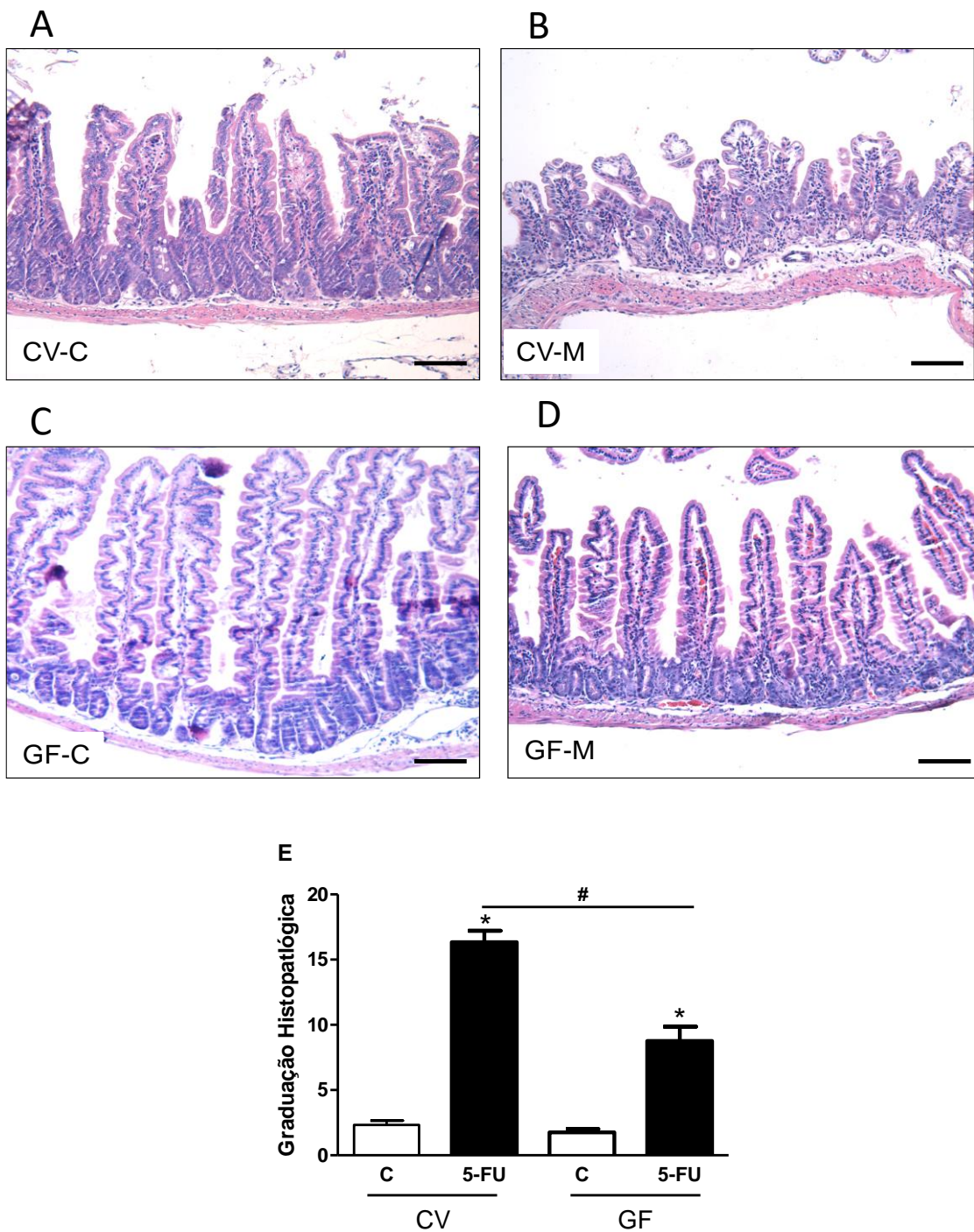


Figura 10: Representação histológica e graduação histopatológica do jejuno de camundongos convencionais (CV) e isentos de germes (GF) controle (C) ou com mucosite (5-FU). Jejuno dos animais CV-C (A) e CV-5FU (B) e dos GF-C (C) e GF-5FU (D) em aumento de 10X. Os camundongos receberam 3 injeções de 5-FU durante 3 dias consecutivos e foram eutanasiados 48 horas após última injeção. Escore histopatológico do

jejuno, conforme descrito na secção materiais e métodos (E). As barras, nas pranchas histológicas, representam 100µm. Em E, as barras representam a média ± erro padrão. n= 3-5. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs GF-5FU.

A menor inflamação e lesão tecidual observadas nos animais GF resultou em 100% de sobrevivência avaliada durante 14 dias após início da administração do quimioterápico (Figura 11A) enquanto 100% dos animais CV sucumbiram até 7 dias após início da administração do 5-FU. E ainda, a avaliação de parâmetros clínicos da doença demonstrou que os animais GF apresentam 100% de recuperação após interrupção da administração do quimioterápico, diferentemente do observado nos animais CV que apresentaram progressiva piora clínica (Figura 11B).

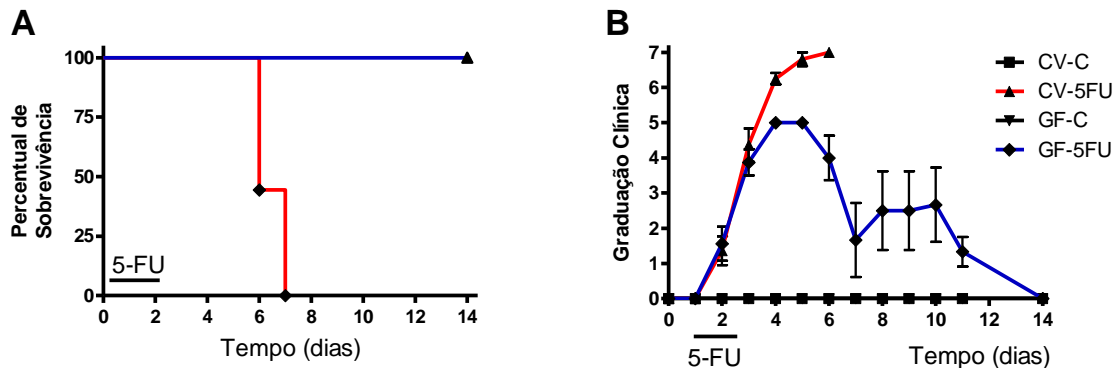


Figura 11: Percentual de sobrevivência após administração de 5-FU a animais convencionais (CV) e isentos de germes (GF) (A). Gradação clínica da doença durante e após administração de 5-FU aferido conforme descrito na secção materiais e métodos diariamente monitorados nos animais CV e GF (B). Nessa avaliação também foi pontuado a perda de peso corporal. As linhas representam a média dos valores encontrados em cada grupo. n=5-6 animais.

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a hiporresponsividade dos animais GF em diferentes modelos inflamatórios estava relacionado com aumento de IL-10 e de anexina 1 (Souza et al., 2004, 2007; Fagundes et al., 2012). No 5º dia após início do tratamento com o quimioterápico não observamos aumento de *IL-10* e nem de anexina 1 nos animais GF tratados com o quimioterápico. Entretanto, como demonstrado na figura 12, a avaliação da expressão mRNA dessas moléculas em tempos anteriores evidenciam que a *anexina 1* (Figura 12A) está aumentada no 1º dia após início do tratamento com o 5-FU e a *il-10* (Figura 12B) está aumentada no 3º dia após início do tratamento com o quimioterápico.

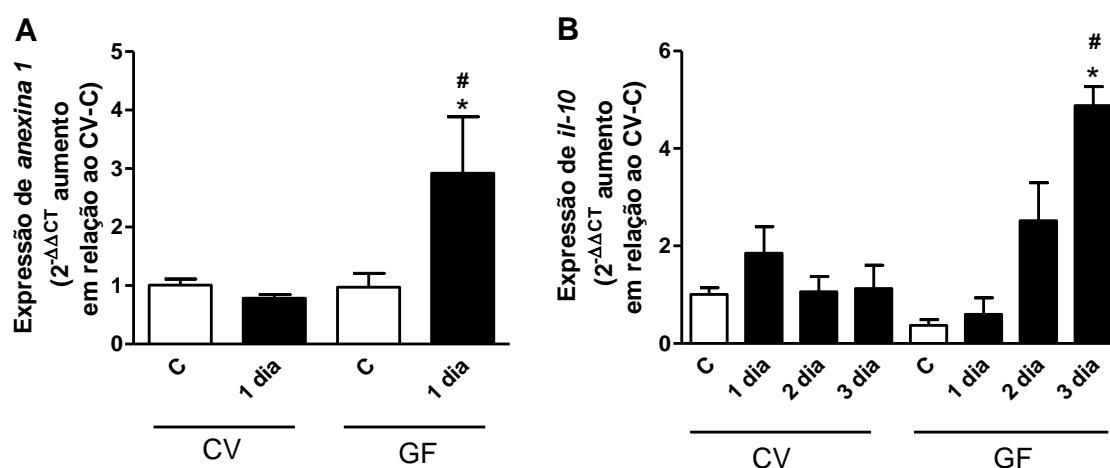


Figura 12: Expressão do mRNA de *anexina 1* (A) e de *il-10* (B) 6 horas após a injeção de 1 (1 dia), 2 (2 dias) ou 3 (3 dias) doses do quimioterápico em animais convencionais (CV) e isentos de germes (GF). As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-4. *P<0,05 vs respectivo controle C ou #P<0,05 vs CV.

O tratamento de animais convencionais neonatos por 60 dias com um coquetel de antibióticos (AB) de amplo espectro para depleção da microbiota foi outra estratégia experimental utilizada para confirmar se a ausência da microbiota estaria envolvida no agravamento do mucosite induzida pelo quimioterápico 5-FU. Após 60 dias de tratamento, a depleção da microbiota foi verificada através do cultivo das fezes em meio tioglicolato e BHI. Esses os animais foram então injetados com o quimioterápico 5-FU para indução da mucosite.

A ação antineoplásica do quimioterápico foi confirmada pela verificação da diminuição do número de leucócitos circulantes nos animais AB-5FU quando comparados ao respectivo controle (Figura 13A). Ressaltamos que essa leucopenia foi semelhante a observada nos animais CV e GF após tratamento com o quimioterápico. A depleção da microbiota com antibióticos também resultou em prevenção do encurtamento intestinal induzido pelo quimioterápico, como observado nos animais GF (Figura 13B). E ainda não foi observado aumento da atividade da MPO (Figura 13C) e EPO (Figura 13D) no intestino dos animais AB tratados com o 5-FU, nem na concentração das citocinas CXCL1 (Figura 13E) e IL-1 β (Figura 13F) quando comparados ao grupo controle.

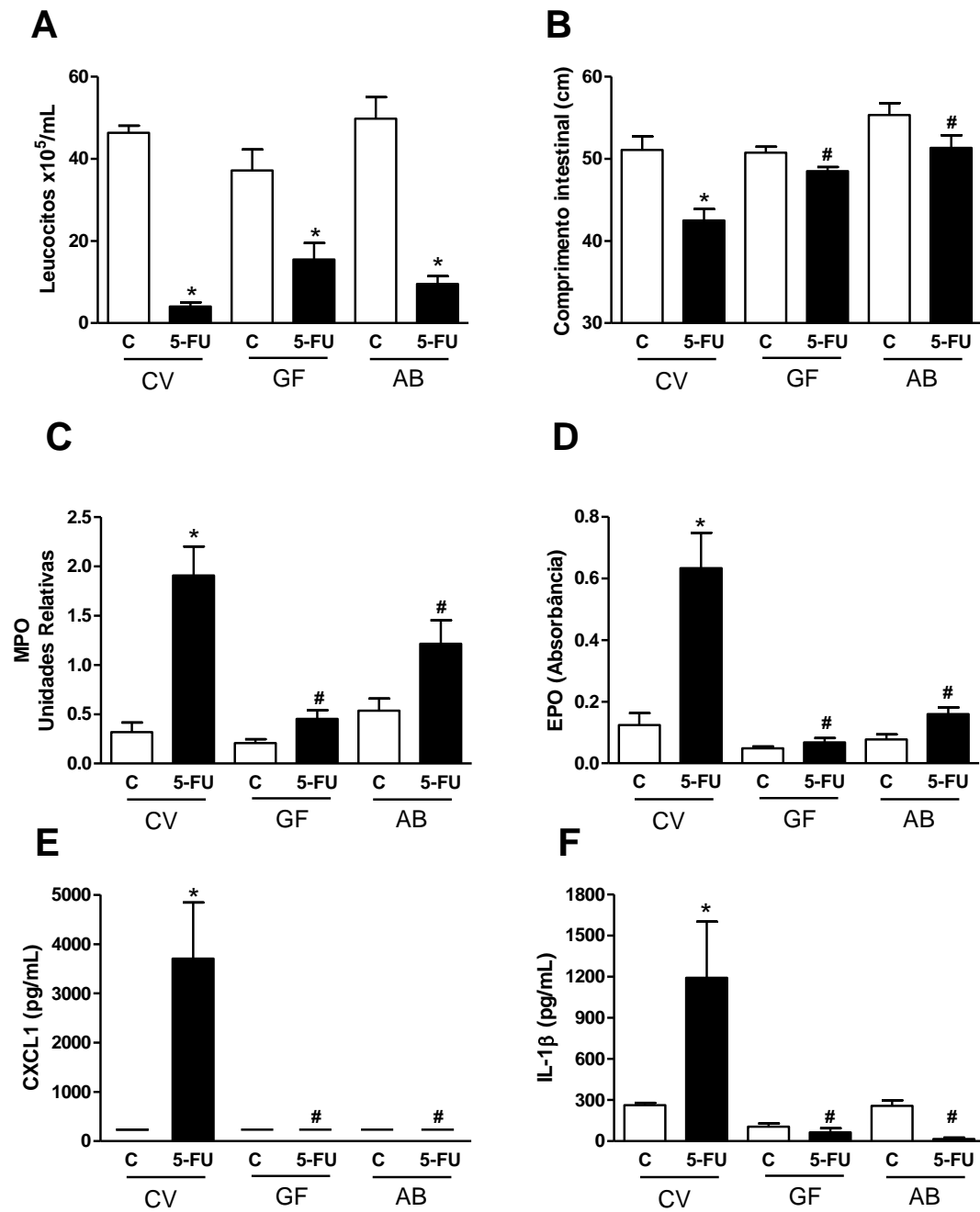


Figura 13: A prevenção da colonização de camundongos neonatos pela microbiota resultou em diminuição da inflamação e da lesão tecidual induzida pelo quimioterápico 5-FU. O tratamento com coquetel de antibióticos (AB) para prevenção da colonização não interferiu na leucopenia induzida pelo 5-FU (A). Os animais AB não apresentaram encurtamento do intestino após tratamento com o 5-FU (B). A atividade das enzimas MPO (C) e EPO (D) e a concentração das citocinas CXCL1 (E) e IL-1 β (F) não foram alteradas nos animais AB

tratados com o quimioterápico quando comparados ao grupo controle. As barras representam a média \pm erro padrão. $n= 3-5$. $*P<0,05$ vs respectivo C ou $\#P<0,05$ vs CV-5FU.

Da mesma forma que observado nos animais GF, a análise dos cortes histológicos demonstrou que o tratamento com 5-FU promoveu poucas alterações na arquitetura intestinal dos animais convencionais tratados com o coquetel de antibiótico quando comparados ao grupo controle e aos animais CV-5FU (Figura 14A). A análise quantitativa das alterações histológicas está representada na figura 14B. Resumidamente, o tratamento com o coquetel de antibióticos desde o nascimento resultou em fenótipo semelhante ao observado nos animais GF, com menor lesão tecidual, menor inflamação e maior preservação da arquitetura intestinal.

A

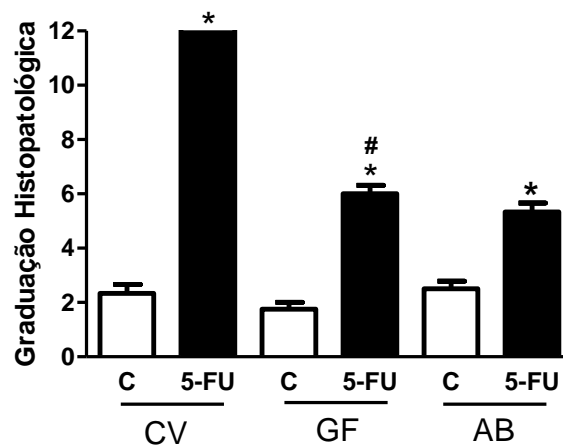
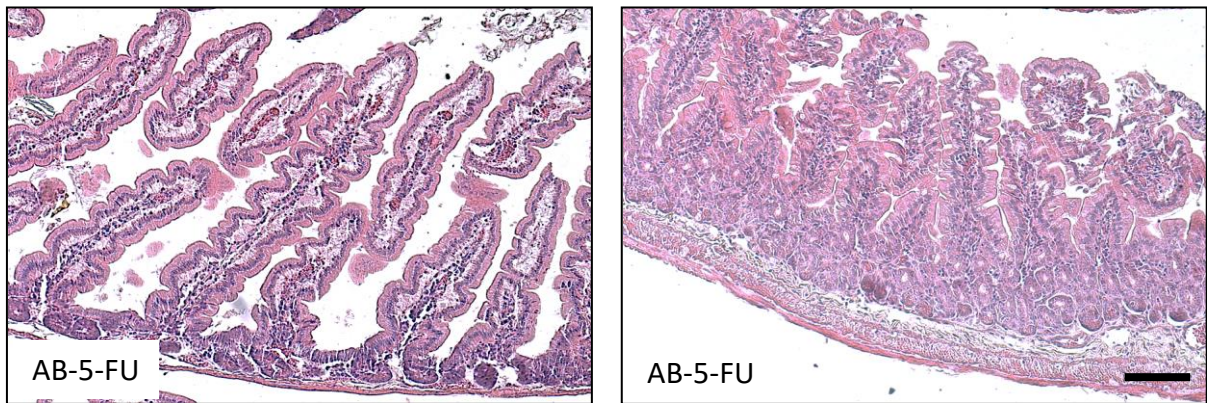


Figura 14: Representação histológica (A) e gradação histopatológica (B) do intestino de camundongos convencionais (CV), isentos de germes (GF) e CV tratados desde o nascimento com coquetel de antibióticos (AB) controle (C) ou tratados com o quimioterápico (5-FU). Duodeno dos animais AB-C e AB-5FU (A) em aumento de 10X. Os camundongos receberam 3 injeções de 5-FU durante 3 dias consecutivos e foram eutanasiados 48 horas após última injeção. Escore histopatológico do duodeno (B), conforme descrito na secção materiais e métodos. As barras, nas pranchas histológicas, representam 100µm. Em B, as barras representam a média ± erro padrão. n= 3-5. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs CV-5FU.

Uma vez que o contato com a microbiota é essencial para vários processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento do intestino e do sistema imune, dentre outros, nos questionamos se a presença da microbiota era requerida durante a indução da mucosite ou se o contato prévio com a mesma seria suficiente para exacerbar o dano tecidual provocado pelo quimioterápico 5-FU. Para responder essa pergunta, nós tratamos camundongos convencionais adultos (6-8 semanas) com coquetel de antibióticos de amplo espectro por 30 dias (AB-A), confirmamos a depleção da microbiota em meios tioglicolato e BHI e procedemos com o protocolo de administração do quimioterápico.

Ambos, camundongos CV e AB-A apresentaram leucopenia após tratamento com o quimioterápico (Figura 15A). A depleção da microbiota resultou em prevenção do encurtamento intestinal induzido pelo quimioterápico (Figura 15B). E ainda foi observado menor atividade de MPO (Figura 15C) e EPO (Figura 15D) no intestino dos animais AB-A tratados com o 5-FU, bem como, menor concentração das quimiocinas CXCL1 (Figura 15E) e CCL24 (Figura 15F) quando comparados ao grupo CV-5FU. A linha tracejada representa a média dos controles CV e AB-A.

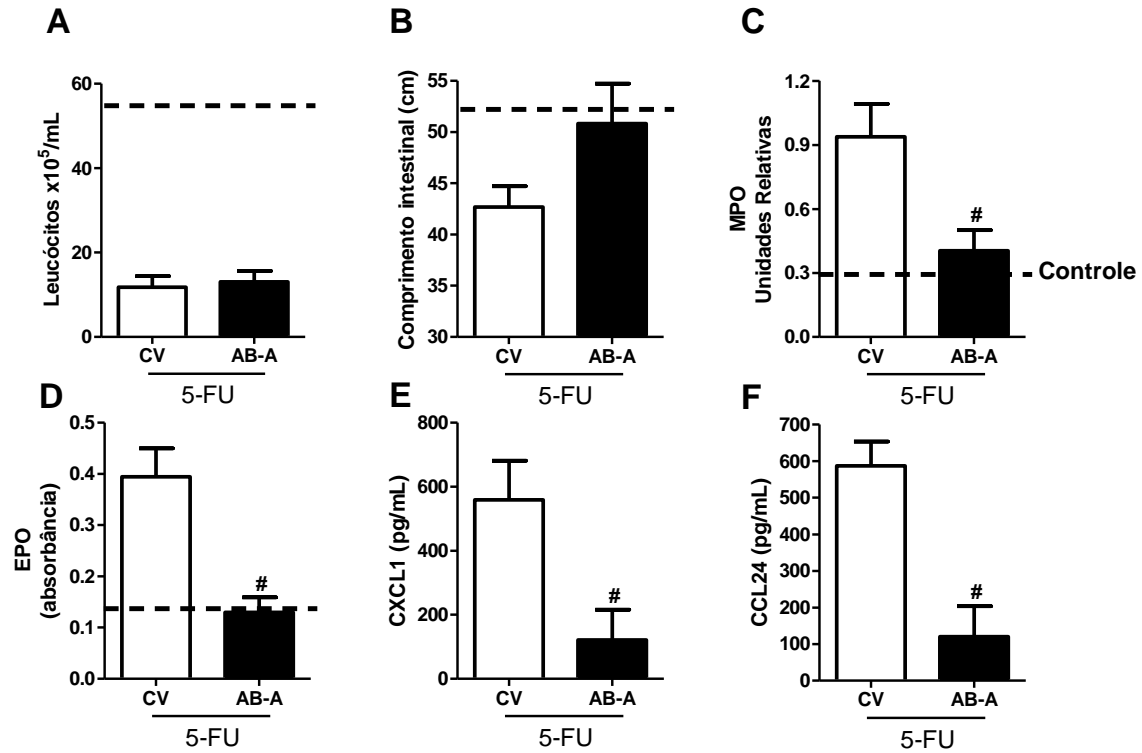


Figura 15: Avaliação fenotípica dos camundongos convencionais adultos tratados com coquetel de antibióticos (AB-A) por 30 dias e injetados com o quimioterápico 5-FU. O tratamento com os antibióticos (AB-A) não interferiu na leucopenia induzida pelo 5-FU (A). Os animais AB-A não apresentaram encurtamento do intestino após tratamento com o 5-FU (B). A atividade das enzimas MPO (C) e EPO (D) e a concentração das citocinas CXCL1 (E) e CCL24 (F) foi menor no intestino dos animais AB-A tratados com o quimioterápico quando comparados ao CV-5FU. As barras representam a média \pm erro padrão. A linha tracejada representa a média dos controles CV e AB-A. $n= 3-5$. # $P < 0,05$ vs CV-5FU.

Além da redução dos parâmetros inflamatórios nos animais AB-A tratados com o quimioterápico foi observada também uma maior preservação da arquitetura intestinal (Figura 16), quando comparado aos animais CV-5FU. Os dados até aqui demonstrados

comprovam que a ausência de microbiota confere proteção dos danos intestinais induzidos pelo quimioterápico 5-FU. Além disso, a hiporresponsividade inflamatória observada na ausência da microbiota não pode ser atribuída a ausência de maturação do sistema imune.

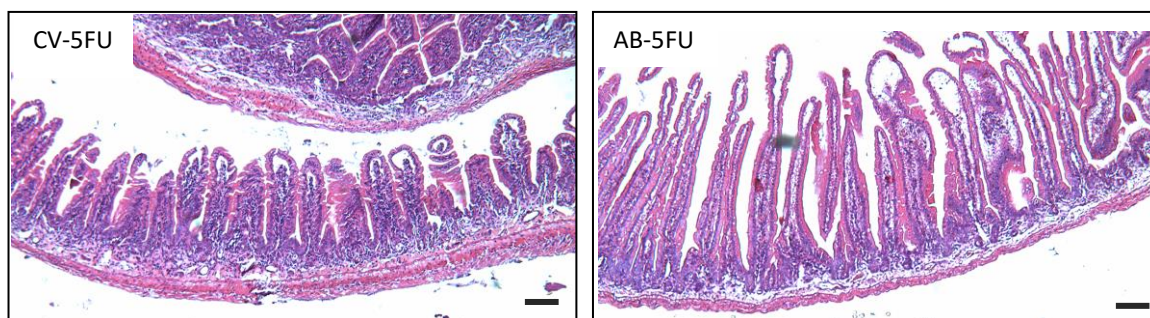


Figura 16: Cortes histológicas do duodeno de camundongos tratados com 5-FU convencionais (CV) e adultos pré-tratados com antibióticos (AB). Secção dos animais convencionais (a esquerda) ou pré-tratados com antibióticos (a direita), em aumento de 10X. As barras representam 50 μm .

A fim de confirmar a hipótese de que a presença da microbiota contribui para o desenvolvimento da mucosite, nós convencionalizamos animais GF através a administração oral de fezes de animais convencionais. Após 30 dias, a convencionalização foi confirmada através do cultivo das fezes nos meios tioglicolato e BHI e então procedemos com o protocolo de indução da mucosite.

A convencionalização não interferiu na leucopenia induzida pelo 5-FU (Figura 17 A). Os camundongos convencionalizados apresentaram encurtamento do intestino após tratamento com o 5-FU (Figura 17B) quando comparados ao seu grupo controle e aos GF-5FU. A atividade das enzimas MPO (Figura 17C) e EPO (Figura 17D) e a concentração das citocinas CXCL1 (Figura 17E) e CCL24 (Figura 17F) foram maiores no intestino dos

animais convencionalizados após tratados com o quimioterápico quando comparados ao seu grupo controle e aos GF-5FU.

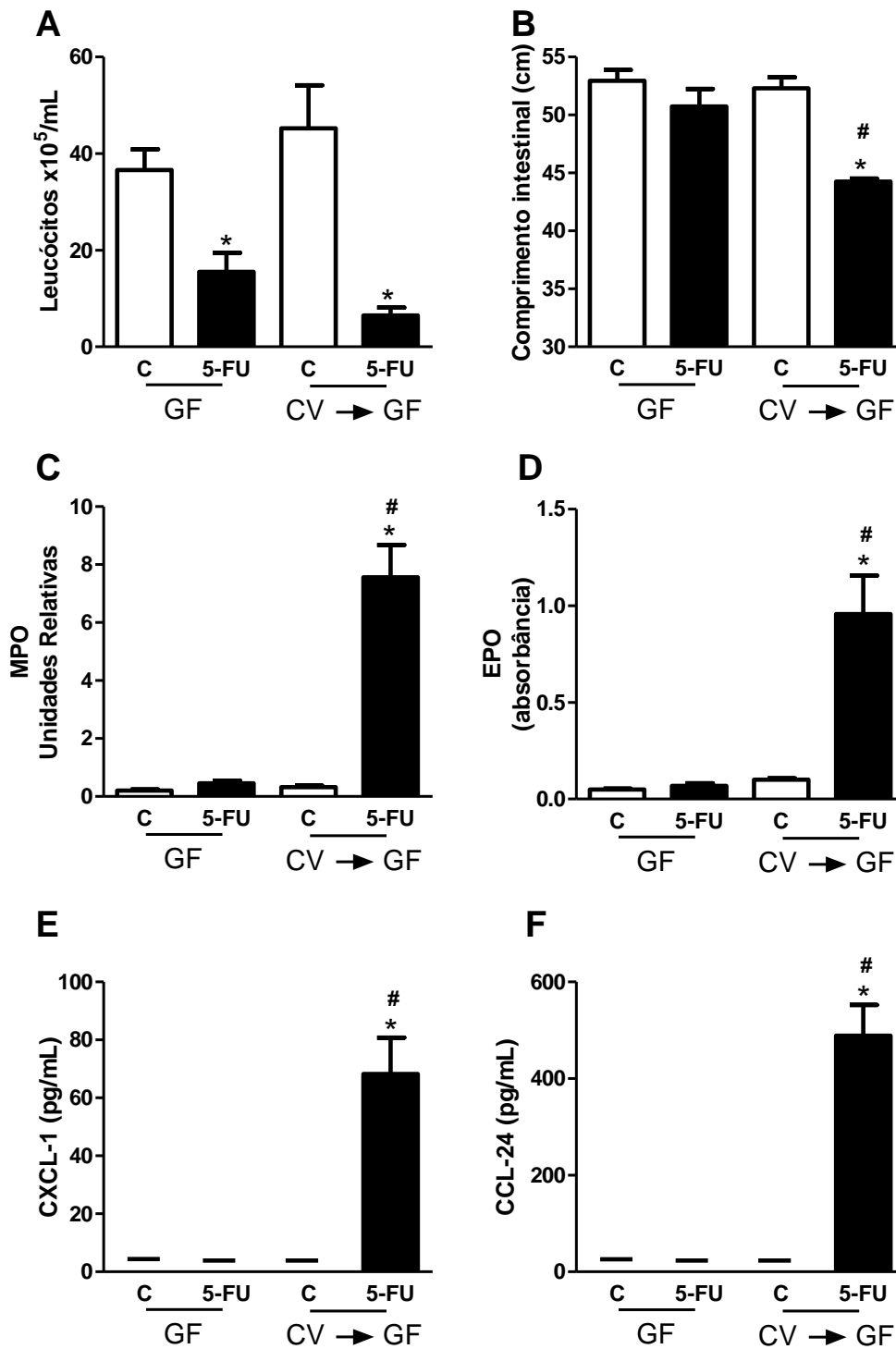
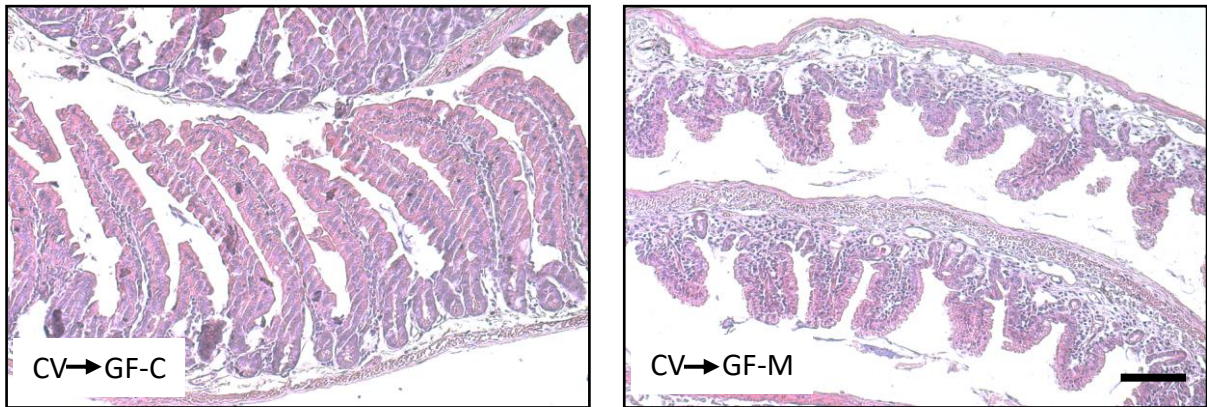


Figura 17: Fenótipo dos animais GF convencionalizados (CV→GF) com fezes de camundongos convencionais durante 30 dias e tratados com o quimioterápico 5-FU. A

convencionalização não interferiu na leucopenia induzida pelo 5-FU (A). Os camundongos convencionalizados apresentaram encurtamento do intestino após tratamento com o 5-FU (B) quando comparados ao seu grupo controle e aos GF-5FU. A atividade das enzimas MPO (C) e EPO (D) e a concentração das citocinas CXCL1 (E) e CCL24 (F) foram maior no intestino dos animais convencionalizados após serem tratados com o quimioterápico quando comparados ao seu grupo controle e GF-5FU. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. * $P < 0,05$ vs respectivo grupo controle, # $P < 0,05$ vs GF-5FU.

A análise microscópica do intestino confirmou que a convencionalização foi capaz de reverter o fenótipo protetor dos animais GF tratados com o quimioterápico 5-FU (Figura 18A). Os animais convencionalizados apresentaram maior redução do vilo, perda da estrutura da cripta, intenso influxo de células inflamatórias na lâmina própria, edema e hiperemia quando comparados aos animais GF-5-FU. A análise quantitativa dessas alterações está representada na figura 18B.

A



B

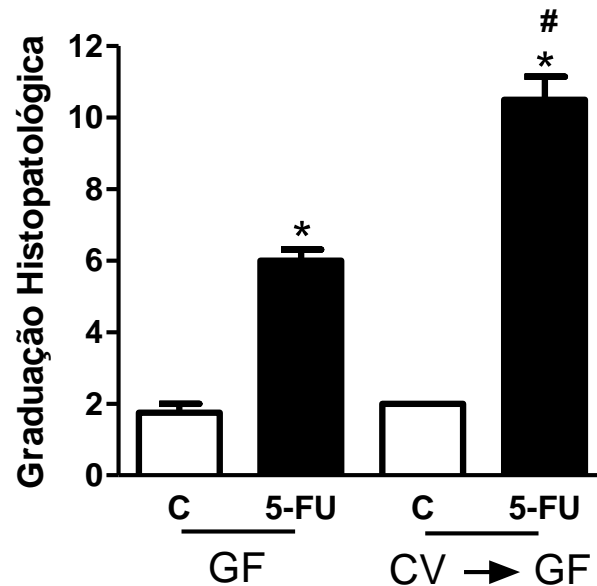


Figura 18: Cortes histológicos do duodeno (A) de camundongos GF convencionalizados controle tratados com o quimioterápico 5-FU. As barras nas pranchas histológicas representam 100 μ m. Gradação histopatológico, conforme descrito na secção materiais e métodos (B). Em B, as barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs GF-5FU.

5.3 *Escherichia coli* exacerba o dano intestinal induzido pelo quimioterápico 5-FU

Uma vez que na presença da microbiota ocorreu exacerbação do dano tecidual induzido pelo quimioterápico, nosso próximo passo foi avaliar se a composição da microbiota estaria alterada após tratamento com 5-FU. Para isso, as fezes de camundongos convencionais controle e tratados com o quimioterápico foram cultivadas em meios seletivos para enterobactérias (Macconkey) e *Bacteoides* spp. (BBE) e em meio enriquecido para bactérias ácido lácticas (MRS). Como demonstrado na figura 19, o tratamento com o 5-FU promoveu aumento expressivo do número de enterobactérias (Figura 19A), enquanto os demais grupos bacterianos avaliados não alteraram ao longo do protocolo experimental (Figura 19B e 19C). Dentro do grupo de enterobactéria, observamos que *E. coli* estava aumentada nas fezes dos animais CV-5FU quando comparados aos animais controle (Figura 19D).

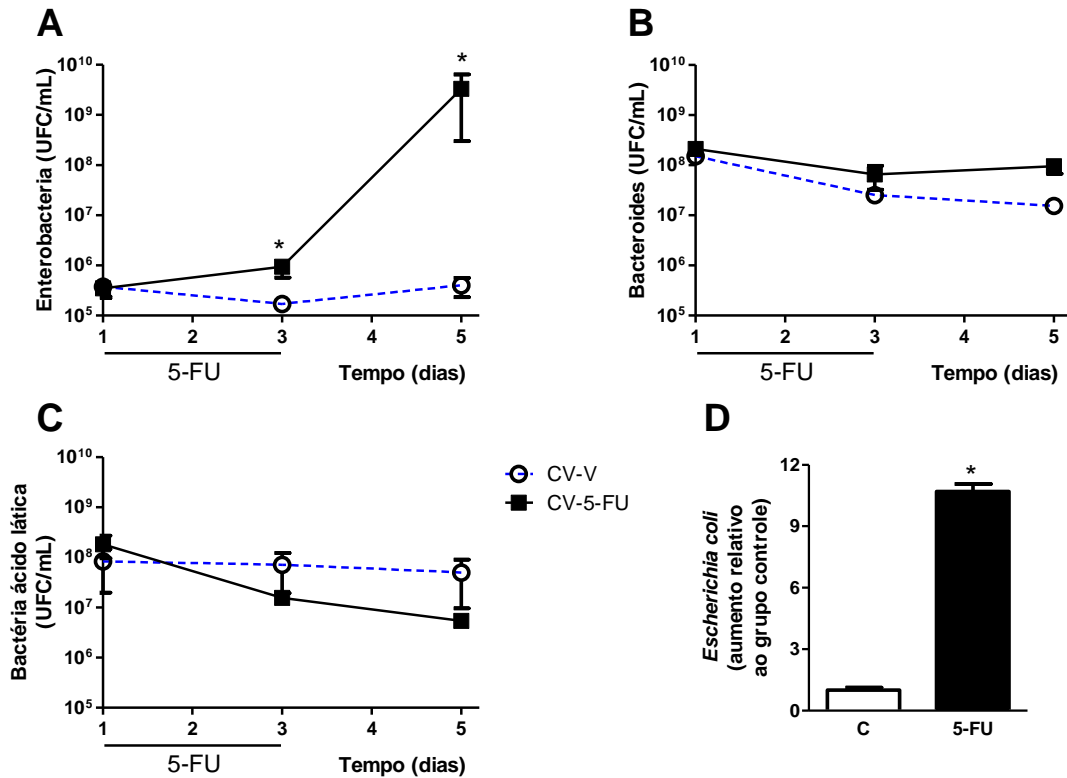


Figura 19: Perfil bacteriano presente nas fezes de camundongos convencionais tratados com o quimioterápico 5-FU. O tratamento com o quimioterápico resultou em expressivo aumento do número de enterobactérias (A) quando comparados ao 1º dia de tratamento e ao grupo controle. O número de colônias de *Bacteroides* (B) e de bactérias ácido lácticas (C) permaneceu constante ao longo o protocolo experimental em ambos os grupos avaliados. A análise de PCR revelou importante aumento de *E. coli* nas fezes dos camundongos convencionais após tratamento com 5-FU (D). As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. * $P < 0,05$ vs grupo controle.

Com a finalidade de avaliar se o aumento de enterobactérias estaria envolvido na exacerbação da mucosite induzida pelo 5-FU, nós tratamos animais CV durante a indução da mucosite com ciprofloxacino (cipro), antibiótico de escolha na clínica para tratamento de infecções por enterobactérias (Mortensen *et al.*, 2013). Grupos de animais tratados com metronidazol (metro) e vancomicina (vanco) (antibióticos que não afetam as

enterobactérias) também foram usados para verificar se a simples diminuição da carga bacteriana conferiria proteção, independentemente do táxon. O metronidazol é usado para tratamento de infecção por Bacteroidetes e bactérias anaeróbias (Löfmark et al., 2010) e a vancomicina atua sobre bactérias Gram-positivo (Marsot *et al.*, 2012).

A administração de ciprofloxacino resultou na diminuição basal de enterobactérias quando comparado ao grupo controle tratado com o veículo (Figura 20A). O tratamento concomitante de ciprofloxacino e 5-FU levou a marcante diminuição da população de enterobactérias nas fezes dos camundongos quando comparado ao grupo 5-FU tratado com veículo. A administração de metronidazol e vancomicina promoveram aumento do número de enterobactérias e no grupo controle e tratamento com 5-FU (Figura 20A).

Em relação a ação antiproliferativa do quimioterápico, nenhum dos antibióticos alterou esse parâmetro (Figura 20B). O tratamento com os 3 antibióticos resultou em menor diminuição do comprimento intestinal quando comparados ao grupo veículo tratado com o 5-FU (Figura 20C). Entretanto, apenas o grupo tratado com ciprofloxacino apresentou prevenção do aumento da atividade de MPO (Figura 20D) e EPO (Figura 20E) quando comparado ao grupo veículo-5FU. O ciprofloxacino foi capaz de reverter o aumento da concentração da quimiocinas CCL11 induzida por 5-FU (Figura 20F).

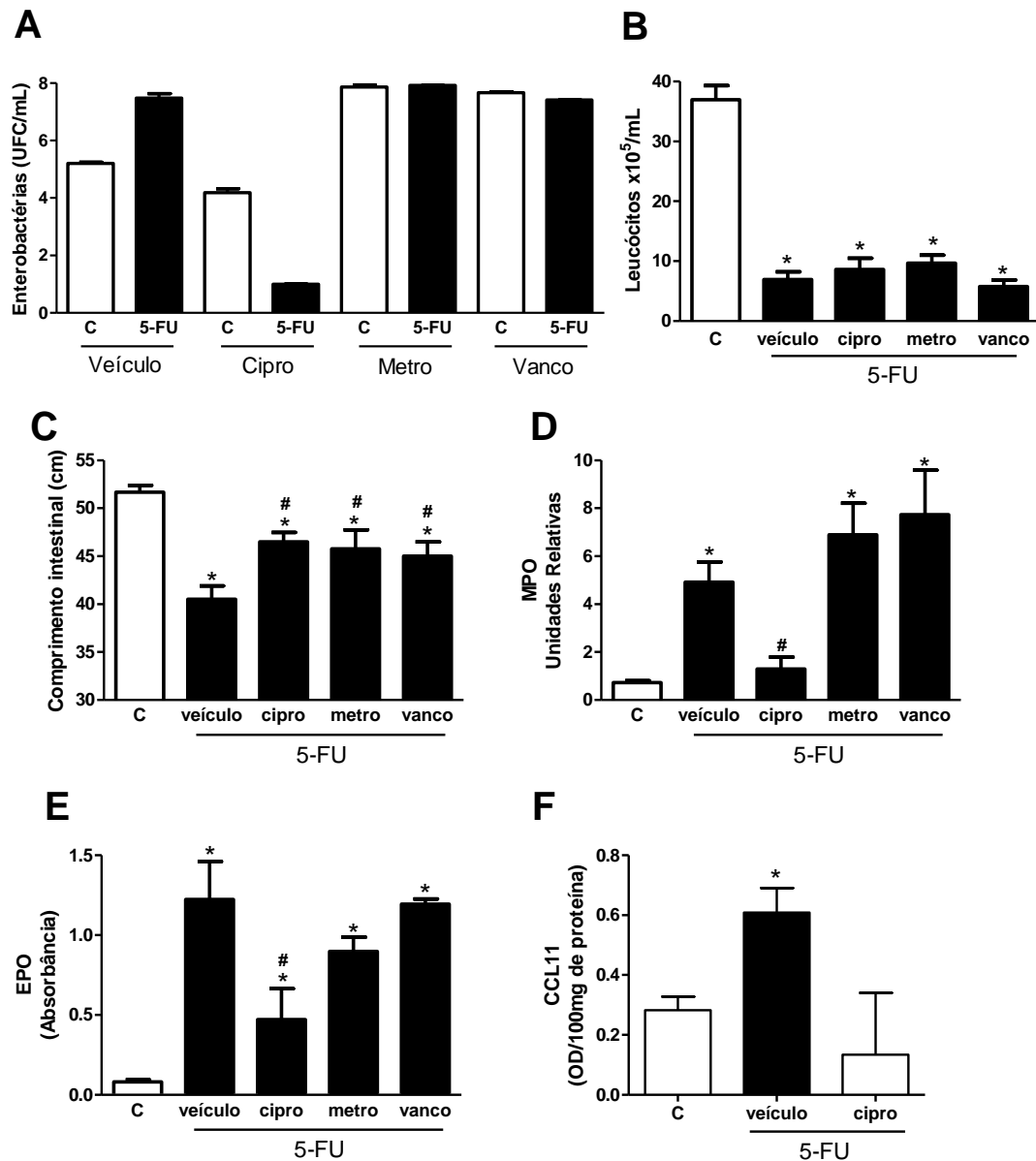


Figura 20: Efeito do tratamento concomitante de 5-FU e dos antibióticos ciprofloxacino (cipro), ou metronidazol (metro) ou vancomicina (vanco). O tratamento com cipro promoveu diminuição no número de enterobactérias presente nas fezes de camundongos controle e tratados com 5-FU, entretanto os outros antibióticos na presença ou ausência de 5-FU promoveram aumento na população desse grupo bacteriano. (A) (eixo Y: escala logarítmica). Os tratamentos distintos não interferiram na leucopenia induzida pelo 5-FU (B). O tratamento com qualquer um dos três antibióticos utilizados resultou em menor encurtamento do intestino após tratamento com o 5-FU (C) quando comparados aos

respectivos controles. Apenas o grupo tratado com cipro apresentou menor atividade das enzimas MPO (D) e EPO (E) quanto comparado ao grupo veículo-5FU. O cipro foi capaz de reverter o aumento da concentração da quimiocina CCL11 induzida por 5-FU (F). As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. * $P < 0,05$ vs respectivo grupo controle, # $P < 0,05$ vs veículo-5FU.

Uma vez que demonstramos que o aumento de enterobactéria contribui para a exacerbação do dano intestinal induzido pelo quimioterápico e que a redução específica desse táxon está associado a melhora parcial do dano tecidual induzido por 5-FU, nós avaliamos se a monoclonização de animais GF com *E. coli* seria capaz de reverter a hiporresponsividade desses animais no modelo de mucosite intestinal induzido pelo 5-FU. Um outro grupo de animais GF também foram colonizados com *Bacteroides fragilis*. Essa bactéria foi escolhida por representa um táxon que não foi alterado durante a indução de mucosite em animais convencionais (Figura 19). E mais, o tratamento com o metronidazol, antibiótico envolvido na eliminação de *Bacteroides* spp, não interferiu no efeito do quimioterápico 5-FU.

Primeiramente, a monoclonização dos animais GF com *E. coli* e *B. fragilis* não alterou os parâmetros basais (grupos controles) avaliados quando comparados aos grupos GF e CV (Figura 21). Em relação à ação antineoplásica do 5-FU, nenhuma das intervenções metodológicas alterou a ação leucopênica do quimioterápico (Figura 21A). Entretanto, os animais monoclonizados com *E. coli* e posteriormente tratados com 5-FU apresentaram aumento da graduação clínica da doença (Figura 21B), com presença de sangue e amolecimento dos fezes quando comparados ao respectivo controle e ao GF-5FU. Em relação ao comprimento intestinal, foi observada redução no grupo monoclonizado com *E. coli* e tratado com o 5-FU quando comparado ao respectivo controle e ao grupo GF-5FU

(Figura 21C). A atividade da MPO (Figura 21D) estava aumentada no grupo monocolonizado com *E. coli* e tratados com o quimioterápico de forma semelhante aos grupos CV-5FU. Interessantemente, os animais GF monocolonizados com *B. fragilis* não apresentaram alterações relevantes em nenhum dos parâmetros avaliados após tratamento com o 5-FU (Figura 21). De forma geral esses animais se comportaram de forma semelhante aos animais GF-5FU.

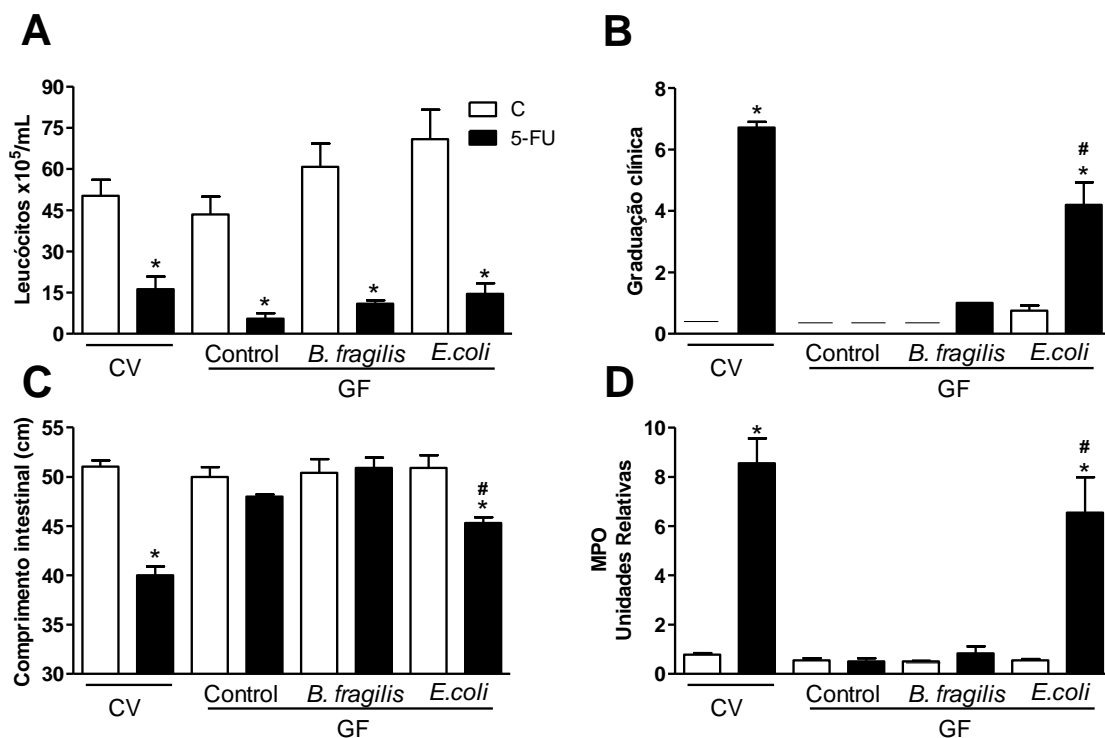


Figura 21: Avaliação do fenótipo de animais GF monocolonização com *E. coli* e *B. fragilis* e tratados com 5-FU para indução da mucosite intestinal. As distintas intervenções experimentais não interferiram na leucopenia induzida pelo 5-FU (A). A monocolonização com *E. coli* resultou em aumento da graduação clínica da doença após tratamento com o quimioterápico em relação ao grupo controle e GF-5FU (B). Animais monocolonizados com *E. coli* apresentaram encurtamento do comprimento intestinal após tratamento com 5-FU quando comparados ao respectivo controle e ao grupo GF-5FU (C). No grupo *E. coli*-

5FU foi observado aumento da atividade das enzimas MPO (D) quando comparado ao grupo controle e GF-5FU. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. * $P < 0,05$ vs respectivo grupo controle, # $P < 0,05$ vs GF-5FU.

A análise histológica do intestino confirmou que a monoclonização com *E. coli* e posterior tratamento com o quimioterápico 5-FU resultou em aumento do dano tecidual e da inflamação quando comparado ao controle (Figura 22A). Entretanto, os animais monoclonizados com *B. fragilis* e tratados com o 5-FU apresentaram menor alteração tecidual quando comparados ao controle. A análise quantitativa dessas alterações está representada na figura 22B. Resumidamente, animais monoclonizados com *E. coli* apresentaram redução dos vilos, perda da estrutura da cripta, intenso influxo de células inflamatórias na lâmina própria, edema e hiperemia quando comparados ao grupo controle e aos animais GF-5FU.

A

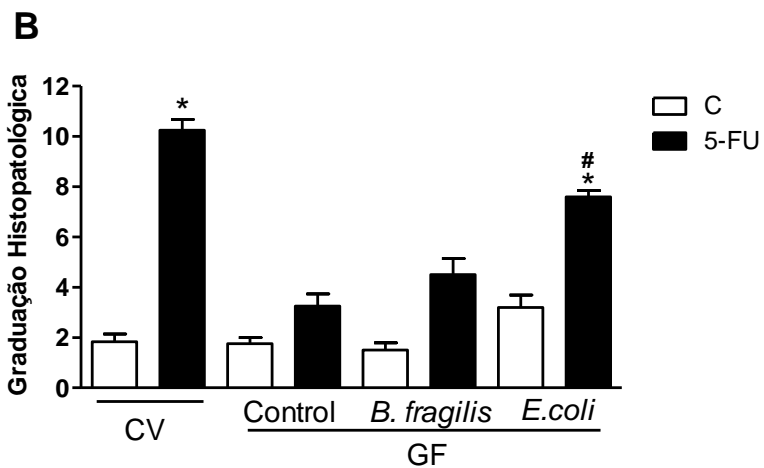
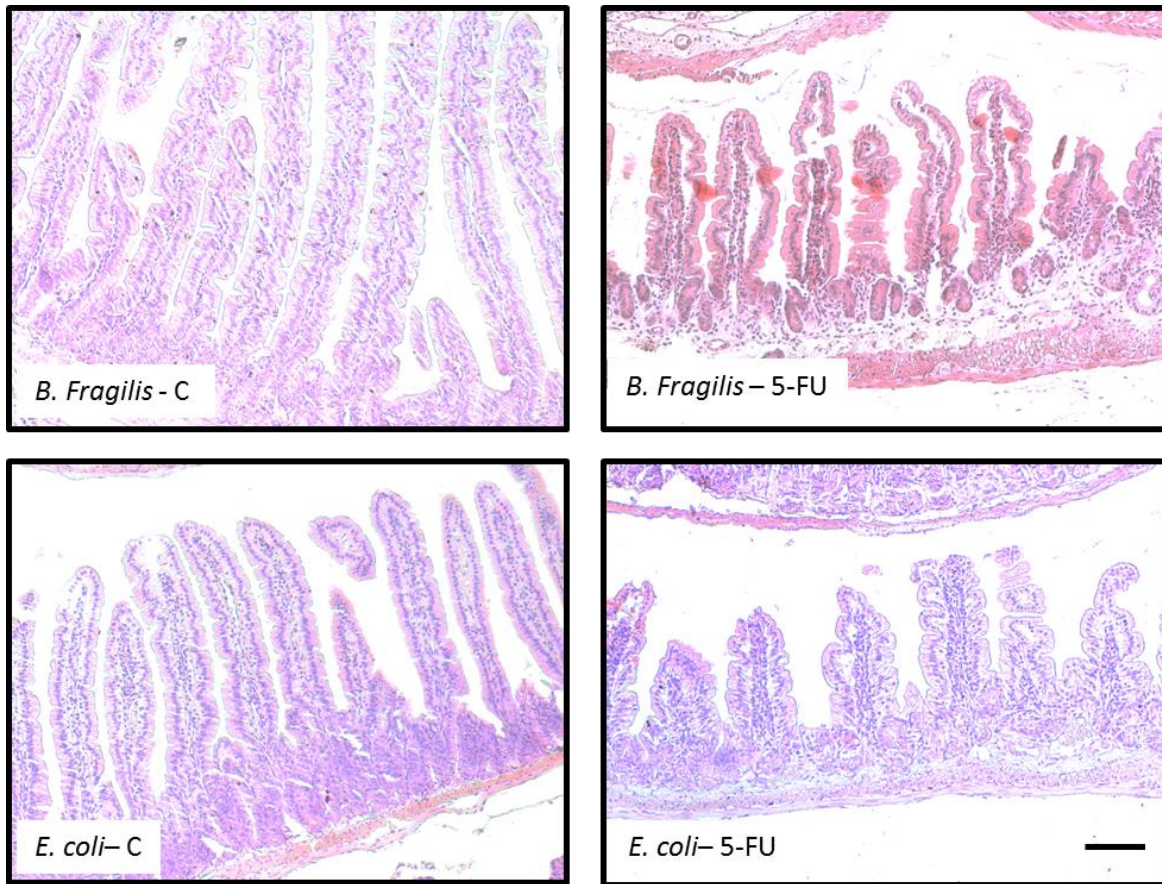


Figura 22: Cortes histológicos do duodeno de camundongos GF monocolonizados com *E. coli* e *B. fragilis* controle e tratados com quimioterápico 5-FU (A). Aumento de 100X. A barra representa 100 μ m. Escore histopatológico, conforme descrito na secção materiais e métodos (B). A monoclonização com *E. coli* promoveu aumento do dano intestinal

induzido pelo 5-FU quando comparado ao controle e ao GF-5FU, entretanto no grupo *B. fragilis* não menor alteração entre os grupos controle e tratados com 5-FU. Em B, as barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. *P<0,05 vs C ou #P<0,05 vs GF-5FU.

A fim de avaliar se o aumento do dano intestinal observado nos animais GF monoclonizados com *E. coli* após tratamento com o quimioterápico não estaria diretamente associado a presença desses microrganismos no intestino, nós usamos uma modelo inflamatório extra-intestinal. O modelo usado constituiu na injeção de carragenina intraplantar para indução de hipernocicepção inflamatória.

Como já demonstrado anteriormente (Amaral et al., 2008), nós também observamos que a intensidade hipernociceptiva é menor nos animais GF quando comparado aos animais CV (Figura 23A). A monoclonização de animais GF com *E. coli* promoveu aumento da intensidade hipernociceptiva. A administração de carragenina a animais convencionais resultou em aumento do peso da pata traseira direita de aproximadamente 50 mg, entretanto nos animais GF esse aumento foi em média de 28 mg (Figura 23B) quando comparado a pata contralateral esquerda que não recebeu carragenina. Os animais monoclonizados com *E. coli* apresentaram aumento significativo do peso da pata traseira direita quando comparados aos GF. A pata dos animais GF tratados com carragenina apresentou menor atividade da MPO quando comparados aos animais CV (Figura 23C). Entretanto a monoclonização com *E. coli* resultaram em aumento da atividade de MPO após injeção de carragenina. Os grupos GF tiveram menor aumento da concentração de TNF α na pata traseira direita após injeção com carragenina quando comparados aos animais CV (Figura 23D). Por outro lado, a monoclonização com *E. coli* resultou em aumento da concentração de TNF α após injeção de carragenina semelhantemente ao observado nos animais CV. De forma geral, os animais monoclonizados com *B. fragilis* apresentaram resultados

semelhantes aos animais GF após injeção com carragenina, como menor intensidade hipernociceptiva e menor concentração de TNF α .

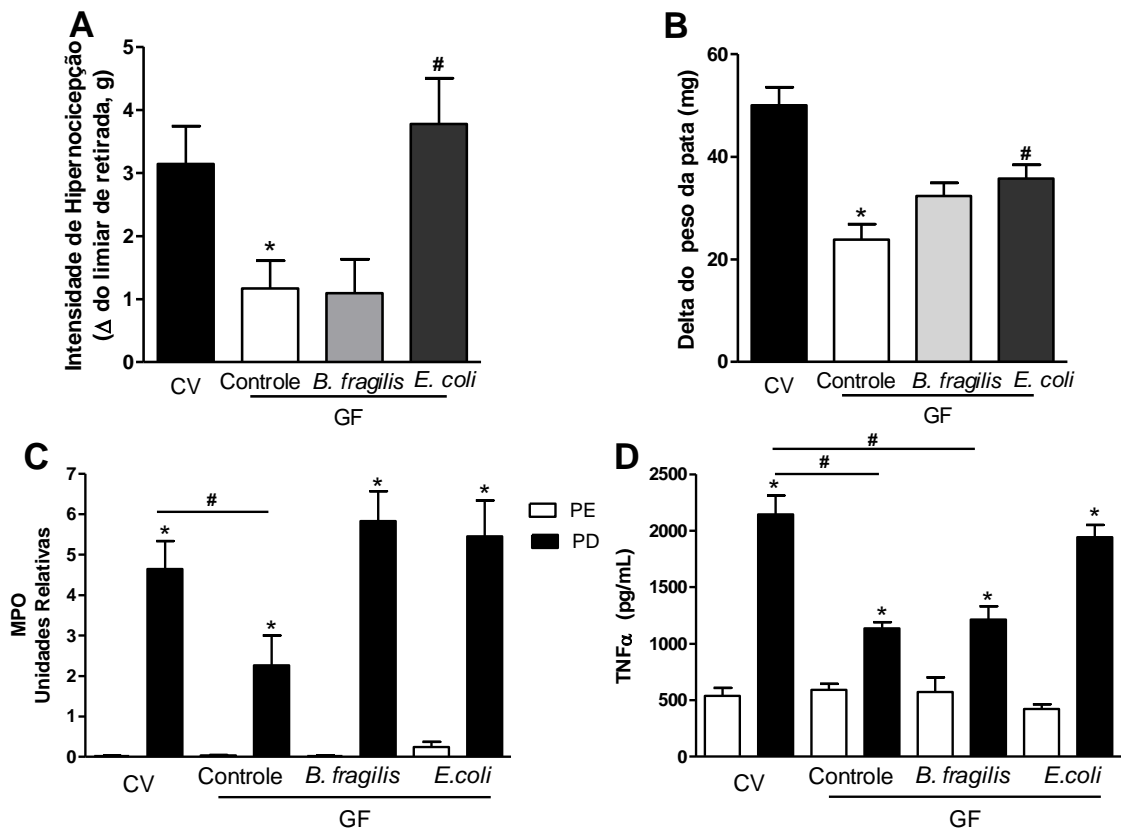


Figura 23: Análise de parâmetros inflamatórios 3h após injeção de carragenina. Os animais GF e monoclonizados com *B. fragilis* apresentaram menor intensidade hipernociceptiva quando comparadas aos animais CV, entretanto a monoclonização com *E. coli* promoveu aumento da hipernocicepção quando comparado aos animais GF (A). A injeção de carragenina resultou em menor aumento do peso da pata traseira direita dos animais GF e monoclonizados com *B. fragilis* em relação a animais CV. A monoclonização com *E. coli* promoveu aumento do peso da pata quando comparados aos GF (B). Animais GF desafiados com carragenina apresentaram menor atividade da MPO quando comparados aos animais CV. Ambas monoclonizações resultaram em aumento da atividade da MPO após injeção de carragenina (C). Após injeção com carragenina, o grupo GF e *B. fragilis* tiveram menor aumento da concentração de TNF α na pata traseira direita quando

comparados aos animais CV (D). Por outro lado, a monoclonização com *E. coli* resultou em aumento da concentração de TNF α . As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5. Nos painéis A e B * P <0,05 vs CV, # P <0,05 vs GF. Nos paines C e D * P <0,05 vs CV, # P <0,05 vs GF

5.4 A corticosterona é importante para a hiporresponsividade inflamatória dos animais GF

Uma vez que a monoclonização com a *E coli* foi capaz de reverter a hiporresponsividade inflamatória dos animais GF, nosso próximo passo foi avaliar qual o mecanismo envolvido nessa reversão. A microbiota é capaz de alterar a produção de hormônios esteroides, como demonstrado na figura 24A. Na ausência da microbiota ocorre aumento da concentração basal de corticosterona plasmática em relação a animais CV. A administração de dexametasona animais convencionais não interferiu na ação leucopênica do quimioterápico (Figura 24B), mas esteve associado a menor encurtamento do intestino quando comparado ao grupo tratado apenas com o 5-FU (Figura 24C). O tratamento concomitante de dexametasona e 5-FU resultaram na redução da atividade da MPO (Figura 24D) e EPO (Figura 24E) e das quimiocinas CXCL1 (Figura 24F) e CCL24 (Figura 24G) quando comparados aos animais tratados apenas com o quimioterápico.

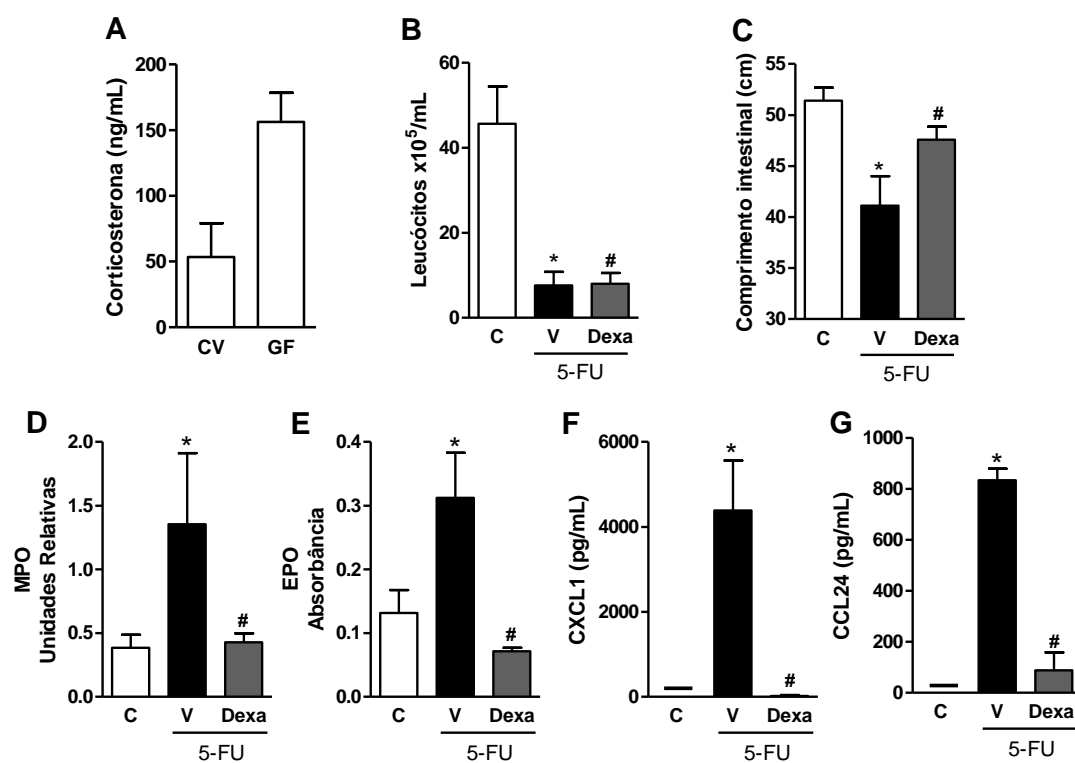


Figura 24: Efeito do tratamento concomitante de 5-FU e dexametasona (dexa). Animais GF apresentam elevada concentração de corticosterona plasmática basal quando comparados aos animais CV (A). O tratamento com dexametasona não interferiu na leucopenia induzida pelo 5-FU (B) e preveniu o encurtamento do intestino após tratamento com o 5-FU (C) quando comparados aos animais tratados apenas com o 5-FU. Foi observada menor atividade das enzimas MPO (D) e EPO (E) e menor concentração das quimiocinas CXCL1 (F) CCL24 (G) no grupo tratado concomitantemente com 5-FU e dexa. As barras representam a média \pm erro padrão. $n= 3-5$. * $P<0,05$ vs grupo controle, # $P<0,05$ vs veículo-5FU.

A fim de avaliar a participação da corticosterona na hiporresponsividade inflamatória dos animais GF no modelo de mucosite, esse grupo foi tratado com o RU486, um antagonista do receptor de glicocorticoide, durante administração do 5-FU. O tratamento com o RU não interferiu na ação leucopênica do quimioterápico (Figura 25A),

entretanto resultou no encurtamento do intestino quando comparado ao grupo GF-5FU (Figura 25B). Ainda, o co-tratamento com o RU486 e 5-FU promoveu ligeiro aumento da atividade da MPO no intestino dos animais GF tratados com o 5-FU (Figura 25C) e aumento das citocinas IL-1 β e CCL24 (Figura 25D) quando comparado aos animais GF-5FU.

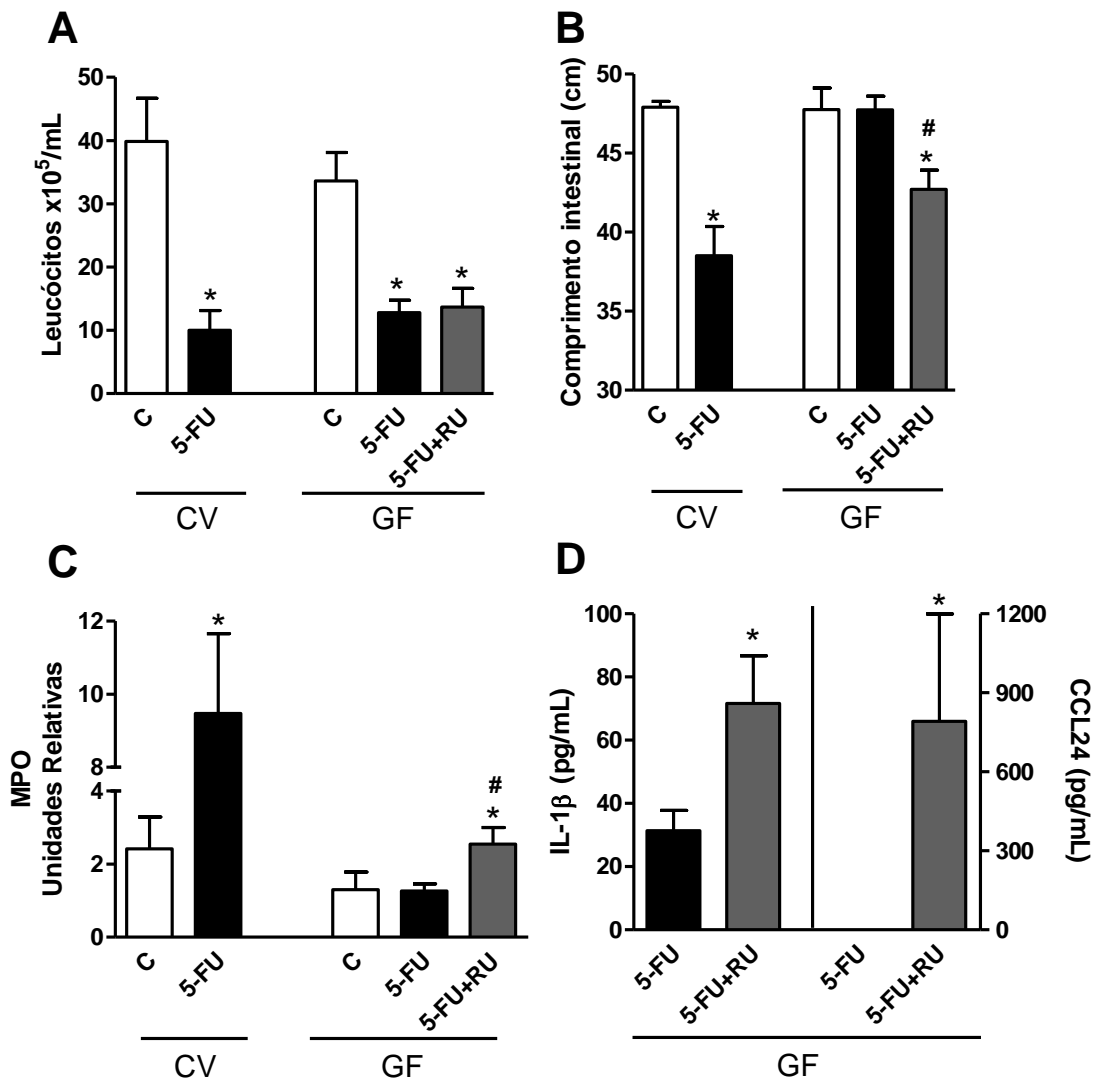


Figura 25: Efeito do tratamento concomitante de 5-FU e RU486. O tratamento com o RU não interferiu na ação antiproliferativa do 5-FU avaliado pela contagem de leucócitos circulantes (A). O co-tratamento com RU e 5-FU resultou no encurtamento do intestino(B), aumento da atividade da MPO (C) e da concentração de IL-1 β e CCL24(D) quando

comparados aos animais GF-5FU. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5.

* $P < 0,05$ vs grupo controle, # $P < 0,05$ vs GF-5FU.

Os dados mostrados acima evidenciam que os glicocorticoides estão envolvidos na atenuação da mucosite induzida pelo quimioterápico 5-FU. Nosso próximo passo foi avaliar se a monoclonização com *E. coli* era capaz de reduzir a concentração de corticosterona. Como demonstrado na figura 26, animais monoclonizados com *E. coli* apresentaram redução da concentração plasmática de corticosterona após serem tratados com o quimioterápico 5-FU quando comparado ao grupo GF-5FU e aos animais monoclonizados com a bactéria *B. fragilis*-5FU.

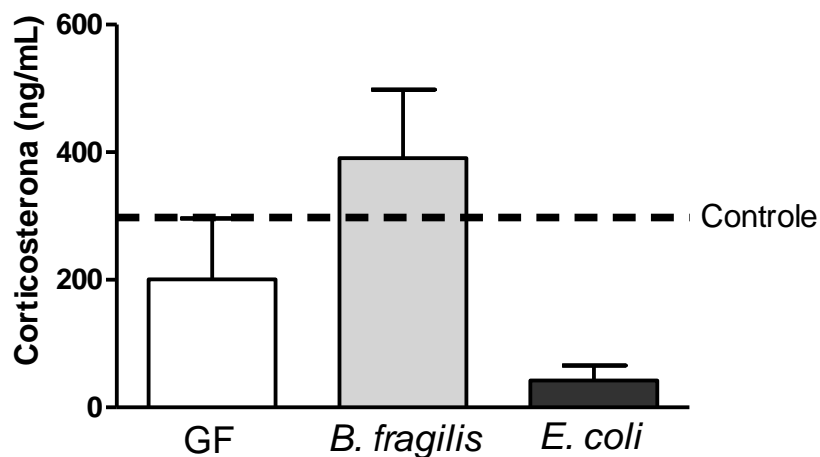


Figura 26: Efeito da monoclonização sobre a concentração plasmática de corticosterona após tratamento com o quimioterápico 5-FU. Animais monoclonizados com *E. coli* apresentaram redução da concentração de corticosterona plasmática quando comparados aos grupos GF ou monoclonizado com *B. fragilis* ambos tratados com 5-FU. As barras representam a média \pm erro padrão. n= 3-5.

4. DISCUSSÃO

Nosso objetivo foi estudar a participação da microbiota no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU em camundongos. Constatamos que (i) na ausência da microbiota ocorre atenuação do dano tecidual e da inflamação induzidos pelo 5-FU; (ii) animais convencionais tratados com 5-FU apresentam aumento da população de enterobactéria e de *E. coli*; (iii) as enterobactérias contribuem para a exacerbação do dano tecidual e da inflamação induzidos pelo 5-FU; (iv) animais isento de germes apresentam aumento da concentração plasmática basal de corticosterona; (v) a monocolonização com *E. coli*, mas não a *B. fragilis*, é capaz de reverter o fenótipo protetor de animais isentos de germes no modelo de mucosite; (vi) e animais GF monocolonizados com *E. coli* apresentam redução da concentração plasmática de corticosterona após injeção de 5-FU.

A mucosite constitui prognóstico negativo para os pacientes em tratamento antineoplásico podendo acarretar na interrupção e ou redução da dose do quimioterápico ou radioterápico (Sonis, 2004). Vários estudos têm demonstrado que a quimioterapia com uso de 5-fluorouracil está associada ao desenvolvimento de mucosite, tanto em humanos (Wang *et al.*, 2013; Keil *et al.*, 2013) quanto em camundongos (Soares *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2012). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mucosite são complexos e envolvem intensa resposta inflamatória, apoptose, além de perda de peso e desordens funcionais e estruturais do intestino (Sonis, 2004). Em nosso modelo visualizamos várias dessas características, tais como perda de peso, aumento da concentração de mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , CXCL1, CCL11 e CCL24), acúmulo de neutrófilos e eosinófilos, redução dos vilos e destruição das criptas no intestino delgado de animais convencionais tratados com a dose de 450 mg/kg de 5-FU por três dias consecutivos quando comparados

aos animais controle. Em adição, no nosso modelo experimental, demonstramos que há um significativo encurtamento do intestino e leucopenia nos animais convencionais tratados com o quimioterápico, corroborando dados da literatura (Cool *et al.*, 2005). Além disso, o tratamento com o quimioterápico resultou no desenvolvimento de diarreia em grande parte dos animais convencionais com presença de sangue e muco. A diarreia é um processo comumente encontrado na mucosite, tanto em humanos (Katsube *et al.*, 2007b) quanto em modelos experimentais (Stringer *et al.*, 2009). Entretanto, Takimoto e colaboradores (2000) demonstraram que 36% dos pacientes que estavam em tratamento de câncer, apresentaram constipação (Tokimoto *et al.*, 2000). Essa disfunção do intestino pode ser justificada por uma alteração da absorção intestinal devido a lesão da mucosa, e ainda pela composição da microbiota e comprometimento da ingestão alimentar.

O aumento da inflamação intestinal observado nos animais convencionais após indução da mucosite, em parte, pode ser atribuída a ativação de NF- κ B e de inflamassoma e consequente aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como já descrito na literatura (Chang *et al.*, 2012; Arifa *et al.*, 2014). De fato, foi observado aumento da concentração de CXCL1 e IL-1 β , no intestino delgado, citocinas conhecidamente envolvidas na patogênese da mucosite (Sonis *et al.*, 2004; Logan *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2008; Arifa *et al.*, 2014). Além dessas citocinas, houve aumento da concentração de CCL11 e CCL24, quimiocinas relacionadas ao recrutamento de eosinófilos (Johnston *et al.*, 2004). O aumento desses mediadores inflamatórios, em especial das quimiocinas CXCL1, CCL11 e CCL24, resultou no acúmulo de células inflamatórias na lâmina própria intestinal dos camundongos convencionais tratados com o quimioterápico 5-FU. Ensaio enzimático e a análise histológica demonstraram acúmulo de neutrófilos e eosinófilos no intestino dos animais convencionais com mucosite. Vários outros trabalhos têm demonstrado a presença de neutrófilos na mucosa após tratamento com quimioterápico

e radioterápico (Melo *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2012; Guabiraba *et al.*, 2014).

Diferentemente do observado nos animais convencionais, camundongos GF ou com a microbiota depletada por antibióticos e tratados com o 5-FU apresentaram atenuação do dano intestinal e da resposta inflamatória induzidos pelo quimioterápico. Esses achados confirmam a hipótese de que a presença da microbiota está envolvida no desenvolvimento da mucosite induzida por 5-FU em camundongos.

Dado anterior da literatura revelam que animais isentos de germes necessitam de maior dose de quimioterápico (irinotecano) para induzir mucosite quando comparados a animais colonizados (Brandi *et al.*, 2006). Entretanto, o irinotecano apresenta uma particularidade: sua forma inativa, glucuronidade SN-38 (SN-38G), é secretada junto com a bile e ao passar pelo intestino, o SN-38G pode ser reconvertido na forma ativa devida ação de bactérias simbióticas que sintetizam a enzima β -glucuronidase (Tobin *et al.*, 2003). Essa reativação do quimioterápico pode resultar em aumento do dano a células epiteliais (Tobin *et al.*, 2003). Como no presente trabalho nosso objetivo foi avaliar o papel da microbiota, escolhemos o 5-fluorouracil, por não apresentar, segundo nosso conhecimento, o viés de ser metabolizado pela microbiota.

A manutenção da microbiota intestinal é crucial para a saúde (Hooper *et al.*, 2012) enquanto que alterações na composição da microbiota (disbiose) pode desestabilizar a relação mutualística e influenciar a fisiologia do hospedeiro, comprometendo o estado de saúde do mesmo (Heimesaat *et al.*, 2006; Hawrelak & Myers, 2004). A disbiose intestinal tem sido associada com importantes doenças humanas, incluindo as doenças inflamatórias intestinais e ileíte (Heimesaat *et al.*, 2006; Kamada *et al.*, 2013) e até mesmo a mucosite (Stringer *et al.*, 2007b e 2009b, e Von Bultzingslowen *et al.* 2003). Entretanto os mecanismos moleculares pelos quais a microbiota contribui para o desenvolvimento dessas

doenças ainda precisam ser elucidados. Nós observamos aumento na população de enterobactérias especialmente *E. coli* durante a indução de mucosite em animais convencionais. Além disso, também demonstramos que essa disbiose contribuiu para a exacerbação da mucosite induzida pelo 5-FU nesse grupo de animais.

Alguns trabalhos mais recentes também têm sugerido a participação da microbiota na mucosite tanto em animais quanto em humanos (Stringer *et al.*, 2009b; 2014; von Bültzingslöwen *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2009; 2010). Esses autores relataram alteração na composição da microbiota intestinal após tratamento quimioterápico (Stringer *et al.*, 2009b; von Bültzingslöwen *et al.*, 2003; van Vliet *et al.*, 2009). Stringer e colaboradores (2009b) demonstraram que após uma única dose de 5-FU em ratos ocorre diminuição de *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. no cólon de ratos. Enquanto nas fezes foi encontrado aumento de *Clostridium* spp. e *Staphylococcus* spp. Usando o mesmo quimioterápico por 6 dias em ratos, um outro estudo encontrou aumento no número total de bactérias anaeróbias facultativas no cólon (von Bültzingslöwen *et al.*, 2003). O tratamento de ratos com uma única dose de irinotecano foi associado ao aumento de *Escherichia* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Serratia* spp. e *Staphylococcus* spp. no cólon (von Bültzingslöwen *et al.*, 2003). Em amostras fecais, os autores encontraram aumento de *Proteus* spp., *Clostridium* e *Peptostreptococcus* spp. associado com redução de *Bacillus* spp., e *Bifidobacterium* spp (Stringer *et al.*, 2009b). Em um estudo recente, o número total de bactérias diminuiu após 3 injeções de irinotecano por 3 dias em ratos, particularmente os grupos *Clostridium* cluster IV e XIVa. A administração combinada de irinotecano e 5-FU resultou no aumento de *Clostridium* cluster XI (cluster que contém *C. difficile* spp.) e XIVa (cluster que contém *Clostridium* produtor de butirato) e *Enterobacteriaceae* spp., enquanto que *Clostridium* cluster IV foi reduzido (Lin *et al.*, 2012).

Esses estudos em animais mostram uma drástica mudança na composição da microbiota intestinal após o tratamento com os quimioterápicos 5-FU e irinotecano, com aumento de *Escherichia* spp., e *Clostridium* spp. Essas bactérias são frequentemente isoladas em pacientes com câncer (Montassier *et al.*, 2013). Entretanto esses estudos usaram apenas técnicas baseadas em cultura e técnicas moleculares pouco abrangentes o que permitiu focar apenas nos membros dominantes e cultiváveis da comunidade microbiana resultando em uma visão incompleta. Além disso, nenhum desses trabalhos avaliou diretamente o envolvimento desses grupos microbianos alterados no curso da mucosite e, portanto, apenas sugerem que a disbiose pode aumentar o dano a mucosa induzido pelos quimioterápicos (Thorpe *et al.*, 2013; van Vleet *et al.*, 2009).

As enterobactérias podem influenciar a produção de ROS, a permeabilidade intestinal, a composição da camada de muco e liberação de moléculas imunes efetoras (van Vleet *et al.*, 2010), dentre outros. As enterobactérias são bacilos Gram-negativo, pertencentes ao filo proteobactéria e são membros subdominantes da microbiota indígena humana e de murinos (Guarner, 2012; Winter & Bäumlér, 2014). Nesse grupo de bactérias são encontrados vários patógenos oportunistas, como a *E. coli*, que podem causar doenças em determinadas condições. Vários trabalhos têm demonstrado que o LPS contribui para a inflamação intestinal (Warren *et al.*, 1985; Tsubery *et al.*, 2000). O nosso trabalho foi o primeiro a estudar os mecanismos pelos quais a *E. coli* é capaz de exacerbar o dano intestinal induzido pelo 5-FU.

O efeito direto do quimioterápico 5-FU sobre a microbiota foi avaliado por Stringer e colaboradores (2009b) que demonstraram, *in vitro*, diferenças na susceptibilidade de membros distintos da microbiota ao 5-FU. Enquanto *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* não foram susceptíveis ao tratamento com 5-FU, bactérias importantes para a homeostase do microambiente intestinal foram susceptíveis (Stringer *et al.*, 2009b). O 5-FU é absorvido

pelo trato gastrointestinal (Inomata *et al.*, 2002; Fata *et al.*, 1999), tornando possível seu efeito sobre a microbiota intestinal. Dados clínicos e experimentais têm sugerido que as infecções após tratamentos antineoplásicos são geralmente causadas por bactérias do trato intestinal, como a *E. coli* (Nomoto *et al.*, 1992a, 1992b; Tancrede & Andremont, 1985; Wells *et al.*, 1987). Entretanto, estudos de farmacocinética têm demonstrado que a concentração de 5-FU aplicada intraperitonealmente é bem menor no fluido peritoneal e no cólon que a concentração usada nesse teste *in vitro* (Wei *et al.*, 2008), sugerindo também a implicação de outros mecanismos.

A quimioterapia induz mielossupressão e intensa inflamação intestinal (Soins, 2004). Esse quadro pode favorecer o desenvolvimento de determinados *taxa* bacterianos em detrimento da depleção de outros (Faber & Bäumler 2014; Hasegawa *et al.*, 2014; Winter *et al.*, 2013). Evidências recentes têm sugerido que proteínas liberadas durante processo inflamatório do hospedeiro têm impacto profundo na disponibilidade de nutrientes no lúmen intestinal, podendo levar a alterações na composição da microbiota, como o aumento de enterobactérias (Faber & Bäumler, 2014; Hasegawa *et al.*, 2014; Winter & Bäumler, 2014), como observado no nosso modelo. Em geral, essas proteínas são capazes de limitar a aquisição de alguns nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, como ferro e zinco (Faber & Bäumler, 2014; Winter & Bäumler, 2014). A presença de estratégias alternativas para a aquisição de metais confere vantagem adaptativa durante inflamação intestinal, como é o caso das enterobactérias (Winter & Bäumler, 2014)

Além de mudar a composição da microbiota por limitar a aquisição de metais no lúmen intestinal, a resposta inflamatória do hospedeiro altera o ambiente do lúmen através da geração de subprodutos oriundos da própria inflamação, como de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Alguns *taxa* bacterianos, como as enterobactérias, podem facilmente utilizar esses subprodutos em contraste com bactérias anaeróbias

obrigatórias pertencentes às classes Bacteroidia e Clostridia que em condições normais são os grupos dominantes da microbiota intestinal. O aumento de enterobactérias é comumente observado em diversas doenças inflamatórias intestinais, como colite e doença de Chron (Winter *et al.*, 2013; Winter & Bäumlér, 2014). Um dos mecanismos responsáveis pelo aumento de Enterobactérias no intestino durante a inflamação é a geração de aceptores de elétrons respiratórios a partir de subprodutos da resposta inflamação do hospedeiro. Por exemplo, ROS e RNS produzidos por enzimas do hospedeiro durante a inflamação podem reagir e formar peroxinitrito (ONOO^-) um potente antimicrobiano que é rapidamente convertido em nitrato em uma reação catalisada pelo dióxido de carbono (CO_2). Por sua vez, o nitrato suporta o crescimento luminal de Enterobactérias e *E. coli* (Winter *et al.*, 2013b; Winter & Bäumlér, 2014; Faber & Bäumlér, 2014) como observado no nosso modelo, por ser facilmente usado com acceptor de elétron por esse grupo de bactérias. Serão necessários mais estudos para confirmar a participação de ROS e de RNS na disbiose observada no modelo de mucosite intestinal induzida pelo 5-FU em camundongos. Entretanto ressaltamos que foi observado aumento do estresse oxidativo no intestino dos camundongos convencionais tratados com o 5-FU (dados não mostrados), sugerindo a possibilidade da participação desse mecanismo na disbiose observada no nosso modelo. Os eventos que de fato levam ao aumento da abundância de Enterobactérias durante a mucosite ainda precisam ser elucidados.

Embora haja vários relatos na literatura demonstrando que as enterobactérias e *E. coli* estão aumentadas em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004; Swidsinski *et al.*, 2002; Kotlowski *et al.*, 2007; Baumgart *et al.*, 2007; Heimesaat *et al.*, 2007; Sepehri *et al.*, 2007), ainda não se sabe se a doença resulta do aumento do números dessas bactérias ou se esse é um fenômeno decorrente da doença (Wohlgemuth *et al.*, 2009; Pilarczyk-Zurek *et al.*, 2013). Em animais deficientes para IL-

10, o aumento de *E. coli* não foi correlacionado com a gravidade da inflamação no cólon (Wohlgemuth *et al.*, 2009). A análise feita em biópsias de pacientes com colite ulcerativa mostrou significativo aumento da população de *E. coli* quando comparados aos grupos em remissão da doença e controle (Pilarczyk-Zurek *et al.*, 2013). No nosso modelo demonstramos que a prevenção do aumento de enterobactérias mediado pelo uso de ciprofloxacino confere proteção ao tecido intestinal e diminuição da resposta inflamatória. De forma interessante, o tratamento com outros dois antibióticos, metronidazol e vancomicina, que não inibiram o aumento de enterobactérias não interferiram na lesão induzida pelo quimioterápico. A hipótese de que as enterobactérias podem exacerbar a mucosite intestinal é reforçada pela reversão da proteção intestinal dos animais GF após monocolonizados com *E. coli*, mas não com *B. fragilis*, e tratamento com 5-FU.

Alguns trabalhos têm demonstrado a participação de receptores do tipo toll (2, 4, 5 e 9) no desenvolvimento da mucosite (Burdelya *et al.*, 2012; Kaczmarek *et al.*, 2012; Sukhotnik *et al.*, 2014). As enterobactérias e a *E. coli* potencialmente podem sinalizar via esses receptores e de outros PPRs e assim amplificar a resposta inflamatória durante a mucosite intestinal. O efeito do quimioterápico à mucosa pode favorecer a translocação bacteriana (Sonis, 2004; van Vliet *et al.*, 2010) e permitir um maior contato com os PPRs. Embora não tenhamos recuperado bactérias no peritônio dos animais (lavado peritoneal) pode ter ocorrido translocação local do lúmen para a lâmina própria, visto que nas pranchas histológicas dos animais com mucosite foi possível observar algumas áreas com erosão do epitélio. Essa translocação permite o contato da microbiota com várias células do sistema imune, ativação de PPRs e amplificação da resposta imune. Mais estudo serão necessário para avaliar se nesse modelo de mucosite ocorre translocação bacteriana para a lâmina própria e se as enterobactérias e a *E. coli* participam desse processo.

Vários trabalhos têm relatado que a microbiota é capaz de impactar a resposta inflamatória em diferentes modelos (Souza *et al.* 2004; Fagundes *et al.*, 2012). Nosso grupo havia previamente demonstrado que camundongos GF têm hiporresponsividade inflamatória e não morrem após isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior (Souza *et al.*, 2004). Esse hiporresponsividade também foi observado em animais infectados com *K. pneumoniae* (Fagundes *et al.*, 2012). Nesses modelos, o fenótipo hiporresponsivo é mediado pelo aumento de IL-10 e outros mediadores anti-inflamatórios (Souza *et al.*, 2004; 2007; Fagundes *et al.*, 2012). No nosso modelo de mucosite induzido pelo 5-FU não observamos aumento da concentração de IL-10 no tempo experimental escolhido para eutanásia dos animais (5 dias). Nós investigamos a ocorrência do aumento de IL-10 no intestino dos animais GF tratados com o quimioterápico em momentos anteriores ao 5º dia após início do tratamento. Constatamos que 6h após administração da 1ª dose (1º dia) e 3ª dose do quimioterápico (3º dia) ocorre aumento na expressão do mRNA de *anexina 1* e *il-10* no intestino dos animais GF-5FU quando comparados aos animais CV-5FU, respectivamente. Esse aumento pode ter contribuído para o fenótipo de hiporresponsividade pró-inflamatória observada nos animais GF após tratamento com o quimioterápico, entretanto mais estudos são necessários para esclarecer essa hipótese.

Além da IL-10, a hiporresponsividade inflamatória do grupo GF pode estar relacionada com a secreção de outros mediadores anti-inflamatórios, como de glicocorticoides (Mukherji *et al.*, 2013; Sudo *et al.*, 2004). Observamos que a concentração plasmática basal de corticosterona, principal glicocorticoide presente no plasma de camundongos, estava aumentada nos animais GF quando comparado ao grupo convencional (Figura 24A). Mukherji e colaboradores (2013) demonstraram que animais com depleção da microbiota após tratamento com coquetel de antibióticos apresentam elevada concentração plasmática de corticosterona basal quando comparado a animais com

colonizados. E ainda, as células epiteliais do intestino (IEC) são responsáveis pelo aumento desse hormônio na ausência da microbiota, excluindo a participação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Esses pesquisadores demonstraram que sinais derivados da microbiota regulam o relógio molecular circadiano das IEC contribuindo assim para a homeostase do hospedeiro. Resumidamente, na ausência da microbiota, a insuficiência de sinalização dos PRRs e, conseqüentemente, da ativação da expressão e atividade de c-Jun, conduz a uma expressão permanente do PPAR α , resultando assim na perda de todos os eventos que exibem um ritmo circadiano nas células epiteliais do intestino (IEC). Essa perturbação do relógio molecular circadiano, caracterizada pelo aumento da expressão de RevErb α e a repressão de E4BP4 resultam na expressão constitutiva de Cyp11a1, enzima chave para a síntese de glicocorticoide, levando ao aumento sistêmico de corticosterona (Mukherji *et al.*, 2013).

Em outro trabalho foi demonstrado que animais GF deixados 1 hora em contenção, apresentam aumento de corticosterona plasmática e do hormônio adrenocorticotropina (ACTH), quando comparados aos camundongos convencionais. Esse dado sugere que na ausência de microbiota, estímulos estressantes podem induzir substancial elevação de glicocorticoide via ativação do eixo HPA (Sudo *et al.*, 2004).

No nosso modelo, constatamos que a maior concentração plasmática de corticosterona observada nos animais GF é importante para atenuação do dano intestinal induzido pelo quimioterápico 5-FU. Os glicocorticoides são capazes de se difundir passivamente pela membrana plasmática e interagir com receptor citosólico específico (GR), expresso em todos os tecidos e desencadear a ativação de múltiplos passos de transdução e transcrição genômicas específicas (Escriva *et al.*, 2000). O tratamento com antagonista do receptor de glicocorticoides em GF resultou na reversão parcial do fenótipo protetor desses animais. Por outro lado, a administração de um glicocorticoide sintético,

dexametasona, a animais convencionais resultou em proteção do dano tecidual e redução da inflamação induzidos pelo 5-FU. Esses dados confirmam nossa hipótese do papel do glicocorticoide no fenótipo de hiporresponsividade de animais GF no modelo de mucosite induzido por 5-FU.

Os glicocorticoides podem ser responsáveis por vários dos resultados obtidos no grupo GF-5FU uma vez que os glicocorticoides podem reduzir o número de neutrófilos e eosinófilos, bem como, inibir a síntese de várias citocinas pró-inflamatórias, além de aumentar a síntese moléculas de anti-inflamatórias, como anexina 1 e IL-10 (Zen *et al.* 2011), dentre outros. De fato, nós observamos menor concentração de citocinas pró-inflamatórias no intestino dos animais GF-5FU e aumento de IL-10 e de anexina 1 no início do tratamento com o 5-FU no grupo GF quando comparado aos animais CV. De forma interessante, dados não publicados do nosso grupo têm demonstrado a participação desses moléculas e de glicocorticoides na hiporresponsividade inflamatória de camundongos GF submetidos a isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior (Fagundes *et al.*, em preparação). Dessa forma, pode-se sugerir que a maior concentração plasmática de corticosterona em animais GF impede o desenvolvimento da mucosite por promover a expressão precoce de moléculas anti-inflamatórias e por inibir a síntese de mediadores pró-inflamatórios.

As monocolonizações de animais GF com *E.coli* ou com *B. fragilis* evidenciaram divergência no controle da concentração plasmática de corticosterona. Observamos que enquanto a *E. coli* reduz os níveis desse hormônio, a *B. fragilis* aumenta a concentração plasmática de corticosterona após tratamento com o quimioterápico quando comparados aos animais GF-5FU. Esse dado nos levou a sugerir que o aumento de *E. coli* durante a mucosite pode exacerbar a inflamação por reduzir a concentração plasmática de corticosterona. Entretanto mais análises serão necessárias para confirmar essa hipótese.

Sudo e colaboradores (2004) já haviam demonstrado anteriormente que animais GF monocolonizados com *Bifidobacterium infantis* apresentam aumento de corticosterona induzido por estresse de contenção semelhante ao observado nos animais convencionais. Entretanto animais monocolonizados com uma *E. coli* enteropatogênica (EPEC) apresentam comportamento semelhante aos animais GF (Sudo *et al.*, 2004). Mais estudos serão necessários para avaliar se a monocolonização com *E. coli* impacta a produção intestinal de corticosterona ou se há envolvimento do eixo HPA.

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que a ausência da microbiota confere proteção aos animais tratados com quimioterápicos 5-FU (Figura 27A). Esse fenótipo protetor pode ser atribuído, em parte, à maior concentração basal de corticosterona, observada nos animais GF. Animais convencionais apresentam disbiose após início do tratamento com o 5-FU caracterizada pelo aumento de enterobactérias e de *E. coli* (Figura 27B). A monocolonização dos animais GF com *E. coli* é capaz de reverter a hiporresponsividade desse grupo e reduzir a concentração plasmática de corticosterona. A prevenção do aumento de enterobactérias, pela administração de ciprofloxacino, atenuou o dano intestinal induzida pelo quimioterápico 5-FU (Figura 27C). É nossa hipótese que a disbiose observada nos animais convencionais exacerba a inflamação e o dano tecidual por interferir no aumento de corticosterona. Esse trabalho evidencia que a manutenção da microbiota intestinal indígena é importante para conter ou até mesmo prevenir o efeito colateral de quimioterápicos sobre a mucosa intestinal. Estratégias, como o uso de probióticos e prebióticos, apresentam potencial promissor na prevenção ou até mesmo terapia da mucosite intestinal.

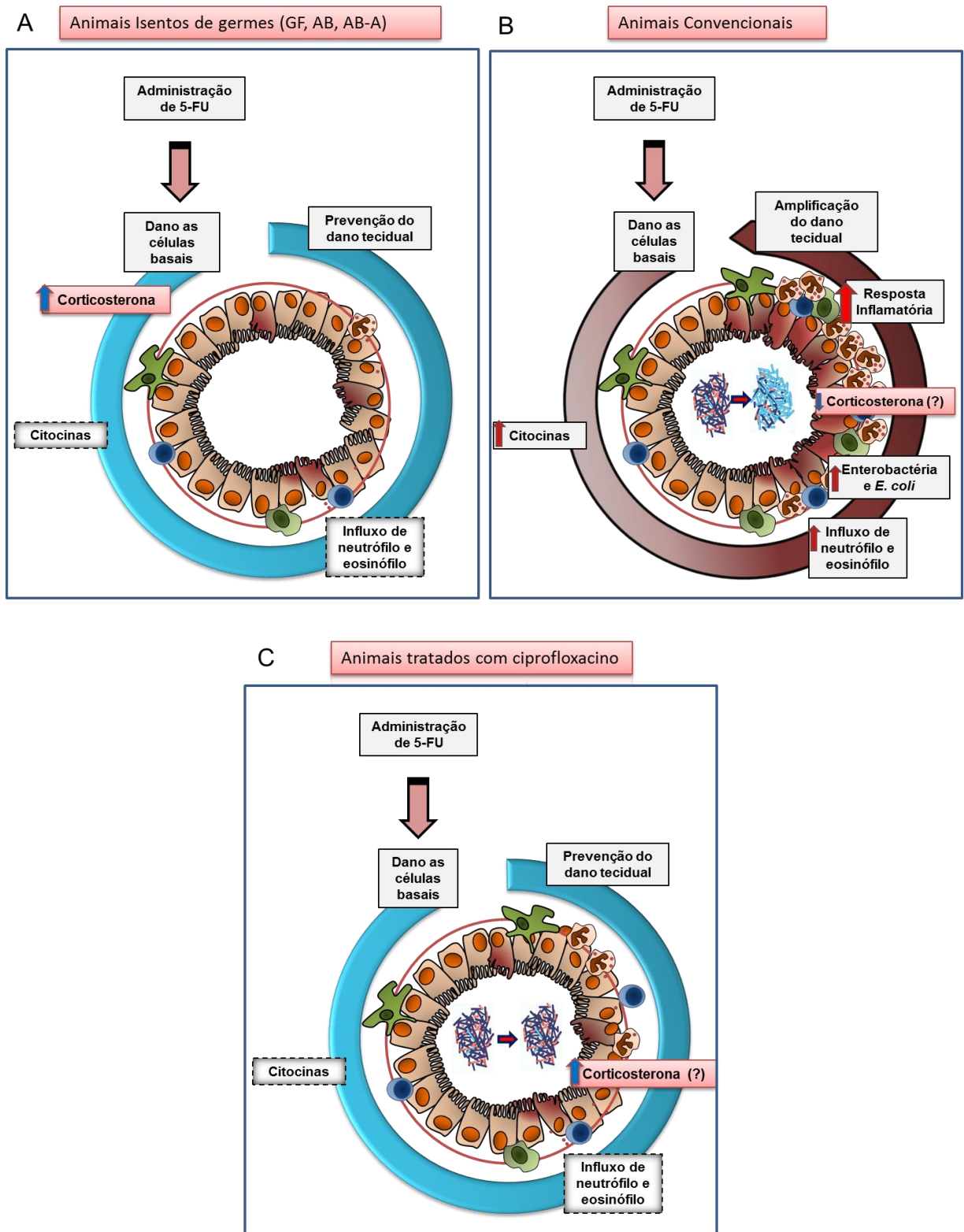


Figura 27: Representação esquemática dos eventos envolvidos na proteção e exacerbação da mucosite induzida por 5-FU na ausência e presença da microbiota, respectivamente. Resumidamente, (A) o tratamento com o quimioterápico 5-FU lesa as células basais do

intestino. Na ausência da microbiota não ocorre inflamação devido a maior concentração de corticosterona basal presente nos animais isentos de germes. (B) Na presença da microbiota a lesão as células basais resulta no aumento da liberação de citocinas (IL-1 β , CXCL1, CCL11 e CCL24) e no influxo de neutrófilos e eosinófilos para o intestino. Nesse contexto ocorre aumento de Enterobactérias e *E. coli*. Essa disbiose pode inibir o aumento de corticosterona e assim exacerbar a o dano tecidual induzido pelo quimioterápico. (C) A prevenção do aumento de enterobactérias reduz a inflamação intestinal e o dano tecidual por aumentar a concentração de corticosterona (?). (A caixa pontilhada representa parâmetros não alterados em relação grupo controle).

7. REFERÊNCIA

- Abraham, C. e R. Medzhitov. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.140, n.6, May, p.1729-37. 2011.
- Abrams, G. D., H. Bauer, *et al.* Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. Lab Invest, v.12, Mar, p.355-64. 1963. 2013.
- Alakomi, H. L., E. Skytta, *et al.* Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl Environ Microbiol, v.66, n.5, May, p.2001-5. 2000.
- Amaral, F. A., D. Sachs, *et al.* Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.6, Feb 12, p.2193-7. 2008.
- Arifa, R.D., M.F. Madeira, *et al.* Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice. Am J Pathol, v.184, n.7, Jul, p.2023-34. 2014.
- Arpaia, N. e. G. M Barton. The impact of Toll-like receptors on bacterial virulence strategies. Curr Opin Microbiol, v.16, n.1, Feb, p.17-22. 2013.
- Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. Nat Rev Immunol, v.8, n.6, Jun, p.411-20. 2008.
- Azevedo, O. G., R. A. Oliveira, *et al.* Apolipoprotein E COG 133 mimetic peptide improves 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis. BMC Gastroenterol, v.12, p.35. 2012.
- Baiula, M., A. Bedini, *et al.* Therapeutic targeting of eosinophil adhesion and accumulation in allergic conjunctivitis. Front Pharmacol, v.3, p.203. 2012.
- Barnes, P. J. Corticosteroid effects on cell signalling. Eur. Respir. J. v.27, p.413–426. 2006.
- Barzal, J.A., C. *et al.* Plasma citrulline level as a biomarker for cancer therapy-induced small bowel mucosal damage. Acta Biochim Pol. Dec. 2014.
- Baumgart, M., B. Dogan, *et al.* Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. ISME J. v. 1, p. 403–418. 2007.
- Blijlevens, N. M., J. P. Donnelly, *et al.* Inflammatory response to mucosal barrier injury after myeloablative therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. Bone Marrow Transplant, v.36, n.8, Oct, p.703-7. 2005.
- Blijlevens, N.M., J.P. Donnelly, De Pauw B.E. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. Bone Marrow Transplant. 25, n.12 Jun; p.1269-78. 2000.

Bode, J. G., C. Ehltling, *et al.* The macrophage response towards LPS and its control through the p38 (MAPK)-STAT3 axis. *Cell Signal*, v.24, n.6, Jun, p.1185-94. 2012.

Brandi G., J. Dabard, *et al.* Intestinal microflora and digestive toxicity of irinotecan in mice. *Clin Cancer Res.* v.12, n. 4, Feb 15, p. 1299-307. 2006.

Brown, E. M., M. Sadarangani, B. Finlay. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat Immunol.* v.14, n.7, Jul, p. 660-7. 2013.

Butler, R. N. Small bowel disorders. In *Bochemical tests of small intestinal function.* Ratnaiken RN, p. 222–230. Ed. rnold, London. 2000.

Burdelya, L. G., A. S. Gleiberman, *et al.* Toll-like receptor 5 agonist protects mice from dermatitis and oral mucositis caused by local radiation: implications for head-and-neck cancer radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, v.83, n.1, May 1, p.228-34. 2012.

Chang, C. T., T. Y. Ho, *et al.* 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor-kappaB activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One*, v.7, n.3, p.e31808. 2012.

Clark, A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* v.275, p.79–97. 2007.

Clavel, T. e D. Haller. Molecular interactions between bacteria, the epithelium, and the mucosal immune system in the intestinal tract: implications for chronic inflammation. *Curr Issues Intest Microbiol*, v.8, n.2, Sep, p.25-43. 2007.

Cool, J. C., J. L. Dyer, *et al.* Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Growth Horm IGF Res*, v.15, n.1, Feb, p.72-82. 2005.

Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, J., *et al.* High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology.* v. 127, p. 412–421. 2004.

De Koning, B. A., J. M. Van Dieren., *et al.* Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. *Int Immunol*, v.18, n.6, Jun, p.941-9. 2006.

Diasio, R. B. e B. E. Harris. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*, v.16, n.4, Apr, p.215-37. 1989.

Dos Santos, L. M., M. M. Santos, *et al.* Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. *Med Microbiol Immunol*, v.200, n.1, Feb, p.29-38. 2011.

Duarte, R., A. M. Silva, *et al.* Influence of normal microbiota on some aspects of the immune response during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Med Microbiol*, v.53, n.Pt 8, Aug, p.741-8. 2004.

- Duncan, M. e G. Grant. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. Aliment Pharmacol Ther, v.18, n.9, Nov 1, p.853-74. 2003.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. Science, v.308, n.5728, Jun 10, p.1635-8. 2005.
- Edlund, C., G. Beyer, *et al.* Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on the normal intestinal microflora. Scand J Infect Dis, v.32, n.1, p.81-5. 2000.
- Elinav, E., T. Strowig, *et al.* NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. Cell, v.145, n.5, May 27, p.745-57. 2011.
- Escriva H., F. Delaunay, V. Laudet. Ligand binding and nuclear receptor evolution. Bioessays; v. 22, p. 717-727. 2000.
- Faber, F., Bäumlér, A. J. The impact of intestinal inflammation on the nutritional environment of the gut microbiota. Immunol Lett. v. 162, n. 2PA, Dec, p. 48-53. 2014.
- Fagarasan, S., M. Muramatsu, *et al.* Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. Science, v.298, n.5597, Nov 15, p.1424-7. 2002.
- Fagundes, C. T., F. A. Amaral, *et al.* Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. J Immunol, v.188, n.3, Feb 1, p.1411-20. 2012.
- Fagundes, C. T., D. G. Souza, *et al.* Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system. Microbes Infect, v.13, n.14-15, Dec, p.1121-32. 2011.
- Fata, F., I. G. Ron, *et al.* 5- fluorouracil-induced small bowel toxicity in patients with colorectal carcinoma. Cancer. v.86, n. 7, p. 1129–1134. 1999.
- Fukata, M., A. Chen, *et al.* Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. Gastroenterology, v.131, n.3, Sep, p.862-77. 2006.
- Gill, S. R., M. Pop, *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science, v.312, n.5778, Jun 2, p.1355-9. 2006.
- Gradishar, W. J. e E. Vokes. 5-Fluorouracil cardiotoxicity: a critical review. Ann Oncol, v.1, n.6, Nov, p.409-14. 1990.
- Grainger, J. R., E. A. Wohlfert, *et al.* Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. Nat Med, v.19, n.6, Jun, p.713-21. 2013.
- Granger, D. N. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. Microcirculation, v.6, n.3, Sep, p.167-78. 1999.

Guarner, F. The enteric microbiota. Granger C.N & Granger J. (Editores) Morgan & Claypool Life Sciences Publishers. p.1-36. 2012.

Guabiraba, R., A. G. Besnard, *et al.* IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. Mucosal Immunol. v.7, n.5, Sep, p.1079-93. 2014.

Han, X., Z. Wu, *et al.*, CXCL9 attenuated chemotherapy-induced intestinal mucositis by inhibiting proliferation and reducing apoptosis. Biomed Pharmacother. v.65, n.8, Dec, p.547-54. 2011.

Han, Y.Q., L. J. Chen, *et al.*. The effects of interleukin-11 on high-dose methotrexate (HDMTX) induced mucositis in Wistar rats. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. v.26, n.2, Feb, p.73. 2005.

Handschel, J., C. Sunderkotter, *et al.* Increase of RM3/1-positive macrophages in radiation-induced oral mucositis. J Pathol, v.193, n.2, Feb, p.242-7. 2001.

Hasegawa, M., S. Yada, *et al.* Interleukin-22 regulates the complement system to promote resistance against pathobionts after pathogen-induced intestinal damage. Immunity. v. 41, n. 4, Oct 16, p. 620-32. 2014.

Hawrelak, J.A.; S.P. Myers. The causes of intestinal dysbiosis. Altern. Med. Rev. v. 9, p. 180–197. 2004.

Heimesaat, M.M., A. Fischer, *et al.* Shift towards proinflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. PLoS ONE v. 2, p. e662. 2007.

Heimesaat M. M., S. Bereswill, *et al.* Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1type immunopathology following oral infectionwith *Toxoplasma gondii*. J. Immu. v.177, n.12, Dec 15, p. 8785-95. 2006.

Hooper, L.V., D. R. Littman and A. J. Macpherson. Interactions between the microbiota and the immune system. Science. v.336, p.1268–1273. 2012.

Hooper, L. V. e A. J. Macpherson. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol, v.10, n.3, Mar, p.159-69. 2010.

Hooper, L. V., M. H. Wong, *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science, v.291, n.5505, Feb 2, p.881-4. 2001.

Houghton, J. A., P. J. Cheshire, *et al.* Potentiation of 5-fluorouracil-leucovorin activity by alpha2a-interferon in colon adenocarcinoma xenografts. Clin Cancer Res, v.1, n.1, Jan, p.33-40. 1995.

Ikuno, N., H. Soda, *et al.* Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. J Natl Cancer Inst, v.87, n.24, Dec 20, p.1876-83. 1995.

Inomata, A., I. Horii, K. Suzuki. 5-Fluorouracil-induced intestinal toxicity: what determines the severity of damage to murine intestinal crypt epithelia? Toxicol Lett. v. 133, n. 2-3 p. 231–240. 2002.

Johnston, I. N., E. D. Milligan, *et al.* A role for proinflammatory cytokines and fractalkine in analgesia, tolerance, and subsequent pain facilitation induced by chronic intrathecal morphine. J Neurosci, v.24, n.33, Aug 18, p.7353-65. 2004.

Kaczmarek, A., B. M. Brinkman, *et al.* Severity of doxorubicin-induced small intestinal mucositis is regulated by the TLR-2 and TLR-9 pathways. J Pathol, v.226, n.4, Mar, p.598-608. 2012.

Kamada N, G. Y, Chen. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. Nat Immunol. v. 14, n. 7, Jul, p. 685-90. 2013.

Katsube, T., K. Ogawa, *et al.* Phase I/II study of irinotecan (CPT-11) and S-1 in the treatment of advanced gastric cancer. Anticancer Drugs, v.18, n.5, Jun, p.605-10. 2007.

Keefe, D.M., J. Brealey, *et al.* Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. Gut. v. 47, p. 632–7. 2000.

Keil, F., E. Selzer, *et al.* Induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil followed by radiotherapy with cetuximab for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Eur J Cancer, v.49, n.2, Jan, p.352-9. 2013.

Kotlowski, R., C. N. Bernstein, *et al.* High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. Gut v. 56, p. 669–675. 2007.

Lake, R. A. e B. W. Robinson. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. Nat Rev Cancer, v.5, n.5, May, p.397-405. 2005.

Lay, C., M. Sutren, *et al.* Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the Clostridium leptum subgroup in human faecal microbiota. Environ Microbiol, v.7, n.7, Jul, p.933-46. 2005.

Lee, Y. K., J. S. Menezes, *et al.* Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.108 Suppl 1, Mar 15, p.4615-22. 2010.

Leitão, R. F., R. A. Ribeiro, *et al.* Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. Cancer Chemother Pharmacol, v.59, n.5, Apr, p.603-12. 2007.

Ley, R. E., P. J. Turnbaugh. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. v. 444, p. 1022–23. 2006b.

Lheureux, S. e S. le Moulec. Molecules involved in apoptosis regulation as therapeutic targets in oncology. Bull Cancer, v.98, n.9, Oct, p.1029-36. 2011.

Libby, P. e M. Aikawa. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. Nat Med, v.8, n.11, Nov, p.1257-62. 2002.

Lin X. B., L. A. Dieleman, *et al.* Irinotecan (CPT-11) chemotherapy alters intestinal microbiota in tumour bearing rats. PLoS ONE 2012; 7:e39764.

Löfmark, S., C. Edlund, C. E. Nord. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. Clin Infect Dis. v. 50, Suppl 1, Jan 1, p. 16-23. 2010.

Logan, R. M., A. M. Stringer, *et al.* Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? Cancer Chemother Pharmacol, v.63, n.2, Jan, p.239-51. 2009.

Logan, R. M., R. J. Gibson, *et al.* Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. Oral Oncol, v.43, n.4, Apr, p.395-401. 2007.

Longley, D. B., D. P. Harkin, *et al.* 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer, v.3, n.5, May, p.330-8. 2003.

Lowenberg, M., A. P. Verhaar, *et al.* Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. EMBO Rep, v.7, n.10, Oct, p.1023-9. 2006.

Lu, H., H. Liu, *et al.* The chemokine CXCL9 exacerbates chemotherapy-induced acute intestinal damage through inhibition of mucosal restitution. J Cancer Res Clin Oncol. Nov. 2014.

Lupp, C., M. L. Robertson, *et al.* Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. Cell Host Microbe, v.2, n.3, Sep 13, p.204. 2007.

Lutgens, L. C., N. M. Blijlevens, *et al.* Monitoring myeloablative therapy-induced small bowel toxicity by serum citrulline concentration: a comparison with sugar permeability tests. Cancer, v.103, n.1, Jan 1, p.191-9. 2005.

Macpherson, A. J., K. D. McCoy, *et al.* The immune geography of IgA induction and function. Mucosal Immunol, v.1, n.1, Jan, p.11-22. 2008.

Mahowald, M. A., F. E. Rey, *et al.* Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. Proc Natl Acad Sci U S A, v.106, n.14, Apr 7, p.5859-64. 2009.

Marsot A., A. Boulamery, B. Bruguerolle, N. Simon. Vancomycin: Review of population pharmacokinetic analyses. Clin Pharmacokinet. v. 51, n. 1, Jan, p. 11-13. 2012.

- Maslowski, K. M., A. T. Vieira, *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. Nature, v.461, n.7268, Oct 29, p.1282-6. 2009.
- Mcmanus, L. M., K. K. Ostrom, *et al.* Radiation-induced increased platelet-activating factor activity in mixed saliva. Lab Invest, v.68, n.1, Jan, p.118-24. 1993.
- Meagher, L. C., J. M. Cousin, *et al.* Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. J Immunol, v.156, n.11, Jun 1, p.4422-8. 1996.
- Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature, v.449, n.7164, Oct 18, p.819-26. 2007.
- Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature, v.454, n.7203, Jul 24, p.428-35. 2008.
- Melichar, B., M. Zezulova. The significance of altered gastrointestinal permeability in cancer patients. Curr Opin Support Care. v.5, p.47–54. 2011.
- Melo, M. L., G. A. Brito, *et al.* Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. Cancer Chemother Pharmacol, v.61, n.5, Apr, p.775-84. 2008.
- Mitrovski, B., J. Pressacco, *et al.* Biochemical effects of folate-based inhibitors of thymidylate synthase in MGH-U1 cells. Cancer Chemother Pharmacol, v.35, n.2, p.109-14. 1994.
- Mittal M., M. R.Siddiqui, et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. Antioxid Redox Signal. v. 20, n. 7, p. 1126-6. 2014.
- Montassier, E., E. Batard, *et al.* Recent changes in bacteremia in patients with cancer: a systematic review of epidemiology and antibiotic resistance. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; v. 32, p. 841–50. 2013.
- Mortensen N. P., N. Boisen, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli*: surface protein dispersin increases bacterial uptake of ciprofloxacin. Int J Antimicrob Agents. v. 42, n. 5, Nov, p. 462-5. 2013.
- Mukherji, A., A. Kobiita, *et al.* Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. Cell, v.153, n.4, May 9, p.812-27. 2013.
- Nejdfors, P., M. Ekelund, *et al.* Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy. Dis Colon Rectum. v.43, p. 1582–7. 2000
- Neish, A. S., A. T. Gewirtz, *et al.* Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. Science, v.289, n.5484, Sep 1, p.1560-3. 2000.

- Neutra, M. R., N. J. Mantis, *et al.* The composition and function of M cell apical membranes: implications for microbial pathogenesis. Semin Immunol, v.11, n.3, Jun, p.171-81. 1999.
- Nomoto, K., T. Yokokura, *et al.* Prevention of indigenous infection of mice with *Escherichia coli* by nonspecific immunostimulation. Antimicrob Agents Chemother. v. 36, n. 2, p. 361–367. 1992.
- Nomoto, K., T. Yokokura, K. Nomoto. Prevention of 5-fluorouracil induced infection with indigenous *Escherichia coli* in tumor-bearing mice by nonspecific immunostimulation. Can J Microbiol. v.38, n. 8, p.774–778. 1992.
- Oliveira, M. R., W. L. Tafuri, *et al.* Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. Parasitology, v.131, n.Pt 4, Oct, p.477-88. 2005.
- Ostanin, D. V., J. Bao, *et al.* T cell transfer model of chronic colitis: concepts, considerations, and tricks of the trade. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.296, n.2, Feb, p.G135-46. 2009.
- Penna, F. J., L. A. Peret, *et al.* Probiotics and mucosal barrier in children. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.11, n.5, Sep, p.640-4. 2008.
- Perretti, M. e F. D'acquisto. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol, v.9, n.1, Jan, p.62-70. 2009.
- Pilarczyk-Zurek, M, Chmielarczyk A, et al. Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. BMC Gastroenterol. v.8, Apr 13, p. 61. 2013.
- Pritchard, D. M., C. S. Potten, *et al.* The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. Cancer Res, v.58, n.23, Dec 1, p.5453-65. 1998.
- Qin, J., R. Li., *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, v.464, n.7285, Mar 4, p.59-65. 2010.
- Round, J. L. e S. K. Mazmanian. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. Nat Rev Immunol, v.9, n.5, May, p.313-23. 2009.
- Russo F., M. Linsalata, *et al.* The effects of fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC60) on the intestinal barrier function and gut peptides in breast cancer patients: an observational study. BMC cancer. v. 13, p. 56. 2013.
- Sansonetti, P. J. War and peace at mucosal surfaces. Nat Rev Immunol, v.4, n.12, Dec, p.953-64. 2004.
- Santi, D. V., C. S. Mchenry, *et al.* Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. Biochemistry, v.13, n.3, Jan 29, p.471-81. 1974.

Sartor, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology, v.134, n.2, Feb, p.577-94. 2008.

Savva-Bordalo, J., J. Ramalho-Carvalho, *et al.* Promoter methylation and large intragenic rearrangements of DPYD are not implicated in severe toxicity to 5-fluorouracil-based chemotherapy in gastrointestinal cancer patients. BMC Cancer, v.10, p.470. 2010.

Sepehri, S., R. Kotlowski, *et al.* Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis, v. 13, p. 675–683. 2007.

Serhan, C. N. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? Am J Pathol, v.177, n.4, Oct, p.1576-91. 2010.

Servin, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev, v.28, n.4, Oct, p.405-40. 2004.

Servin, A. L. e. M. H. Coconnier. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Pract Res Clin Gastroenterol, v.17, n.5, Oct, p.741-54. 2003.

Silva, F. R., E. M. Mattos, *et al.* Isolation and molecular characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from nasal flora of healthy humans at three community institutions in Rio de Janeiro City. Epidemiol Infect, v.127, n.1, Aug, p.57-62. 2001.

Smith, K., K. D McCoy, *et al.* Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. Semin Immunol, v.19, n.2, Apr, p.59-69. 2007.

Soares, P. M., R. C. Lima-Junior, *et al.* Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. Cancer Chemother Pharmacol, v.68, n.3, Sep, p.713-20. 2011.

Soares, P. M., J. M. Mota, *et al.* Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. Cytokine, v.61, n.1, Jan, p.46-9. 2013.

Sommer, H., e D. V. Santi. Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methylenetetrahydrofolate. Biochem Biophys Res Commun, v.57, n.3, Apr 8, p.689-95. 1974.

Sonis, S. T. The pathobiology of mucositis. Nat Rev Cancer, v.4, n.4, Apr, p.277-84. 2004.

Sonis, S. T., D. E. Peterson, *et al.* Prevention of mucositis in cancer patients. J Natl Cancer Inst Monogr, n.29, p.1-2. 2001.

Sonis, S. T., R. L. Peterson, *et al.* Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. Oral Oncol, v.36, n.4, Jul, p.373-81. 2000.

Souza, D. G., C. T. Fagundes, *et al.* The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. J Immunol, v.179, n.12, Dec 15, p.8533-43. 2007.

Souza D. G., A. T. Vieira, *et al.* The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. J Immunol, v.173, n.6, Sep 15, p.4137-46. 2004.

Strath, M. e C. J. Sanderson. Production and functional properties of eosinophils from bone marrow cultures. J Cell Sci, v.74, Mar, p.207-17. 1985.

Stringer A.M., R. M. Logan. The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis. J Oral Pathol Med. 2014.

Stringer, A. M., R. J. Gibson, *et al.* Chemotherapy-induced modifications to gastrointestinal microflora: evidence and implications of change. Curr Drug Metab, v.10, n.1, Jan, p.79-83. 2009.

Stringer, A. M., R. J. Gibson, *et al.* Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-Fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. Exp Biol Med (Maywood), v.234, n.4, Apr, p.430-41. 2009.

Stringer A. M., R. J. Gibson, *et al.* Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. J Support Oncol. v. 5, n. 6, Jun, p. 259-67. 2007.

Strober, W., I. Fuss, *et al.* The fundamental basis of inflammatory bowel disease. J Clin Invest, v.117, n.3, Mar, p.514-21. 2007.

Sudo, N., Y. Chida, *et al.* Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. J Physiol. v.1, n.558 (Pt 1), Jul, p.263-75. 2004.

Sukhithasri, V., N. Nisha, *et al.* Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. Microbiol Res, v.168, n.7, Aug 25, p.396-406. 2013.

Sukhotnik I., Y. Pollak, *et al.* Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. Nutr Metab (Lond). Apr 17, p.11-17. 2014.

Swidsinski, A., A. Ladhoff, *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology v. 122, p. 44–54. 2002.

Takasuna, K., T. Hagiwara, *et al.* Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. Cancer Res, v.56, n.16, Aug 15, p.3752-7. 1996.

Takimoto, C. H., G. Morrison, *et al.* Phase I and pharmacologic study of irinotecan administered as a 96-hour infusion weekly to adult cancer patients. J Clin Oncol, v.18, n.3, Feb, p.659-67. 2000.

- Tancrede, C. H., A. O. Andreumont. Bacterial translocation and gramnegative bacteremia in patients with hematological malignancies. J Infect Dis. v.152, n.1, p. 99–103. 1985.
- Thorpe, D. W., A. M. Stringer, *et al.* Chemotherapy-induced mucositis: the role of the gastrointestinal microbiome and toll-like receptors. Exp Biol Med (Maywood), v.238, n.1, Jan 1, p.1-6. 2013.
- Tobin, P. J., H. M. Dodds, *et al.* The relative contributions of carboxylesterase and beta-glucuronidase in the formation of SN-38 in human colorectal tumours. Oncol Rep, v.10, n.6, Nov-Dec, p.1977-9. 2003.
- Touchefeu Y., E. Montassier, *et al.* Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - current evidence and potential clinical applications. Aliment Pharmacol Ther. v. 40 n.5, Sep, p. 409-21. 2014.
- Tsubery, H., I. Ofek, *et al.* The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: studies on polymyxin B nonapeptide. Biochemistry v. 39, p.11837–11844. 2000.
- Ulluwishewa, D., R. C. Anderson, *et al.* Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. J Nutr. v. 141, p. 769–76. 2011.
- Usselman, B., M. Newbold, *et al.* Deficiency of colonic telomerase in ulcerative colitis. Am J Gastroenterol, v.96, n.4, Apr, p.1106-12. 2001.
- Van Der Sluis, M., B. A. De Koning, *et al.* Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. Gastroenterology, v.131, n.1, Jul, p.117-29. 2006.
- Van Vliet, M. J., H. J. Harmsen, *et al.* The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. PLoS Pathog, v.6, n.5, May, p.e1000879. 2010.
- Van Vliet, M.J., W. J. Tissing, *et al.* Chemotherapy treatment in pediatric patients with acute myeloid leukemia receiving antimicrobial prophylaxis leads to a relative increase of colonization with potentially pathogenic bacteria in the gut. Clin Infect Dis. v.49, n. 2, Jul 15, p. 262-70. 2009.
- Vanderheyde, N., V. Verhasselt, *et al.* Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone. Transplantation, v.67, n.10, May 27, p.1342-7. 1999.
- Vandevyver, S., L. Dejager, *et al.* New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. Endocrinology, v.154, n.3, Mar, p.993-1007. 2013.
- Vilcek, J., M. Feldmann. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. Trends Pharmacol Sci, v.25, n.4, Apr, p.201-9. 2004.

Von Bultzingslowen, I., I. Adlerberth, *et al.* Oral and intestinal microflora in 5-fluorouracil treated rats, translocation to cervical and mesenteric lymph nodes and effects of probiotic bacteria. Oral Microbiol Immunol, v.18, n.5, Oct, p.278-84. 2003.

Wang, J., J. Chang, *et al.* A phase II study of oxaliplatin in combination with leucovorin and fluorouracil as first-line chemotherapy in patients with metastatic squamous cell carcinoma of esophagus. Cancer Chemother Pharmacol, v. 71, n. 4, Apr, p. 905-11. 2013.

Warren, H. S., S. A. Kania, and G. R. Siber. Binding and neutralization of bacterial lipopolysaccharide by colistin nonapeptide. Antimicrob. Agents Chemother. v.28, p.107–112. 1985.

Wei, Z.G., G. X. Li, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of intraperitoneal 5-fluorouracil with a novel carrier solution in rats. World J Gastroenterol. v. 14, n. 14, p. 2179–2186. 2008.

Weiner, H. L., D. J. Selkoe. Inflammation and therapeutic vaccination in CNS diseases. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.879-84. 2002.

Wells, C. L., P. Ferrieri, *et al.* The importance of surveillance stool cultures during periods of severe neutropenia. Infect Control v. 8, n. 8, p. 317–319. 1987.

Winter, S.E., A.J. Bäumlner. Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. Gut Microbes. 2014 Jan-Feb;5(1):71-3.

Winter, S. E., C. A. Lopez, *et al.* The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation. EMBO Rep, Mar 12. 2013a.

Winter S.E., M. G. Winter, *et al.* Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. Science. v. 339, n.6120, Feb 8, p. 708-11. 2013b.

Wohlgemuth, S., D. Haller, *et al.* Reduced microbial diversity and high numbers of one single *Escherichia coli* strain in the intestine of colitic mice. Environ Microbiol. v. 11, n. 6, p. 1562–1571. 2009.

Wohlhueter, R. M., R. S. Mcivor, *et al.* Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. J Cell Physiol, v.104, n.3, Sep, p.309-19. 1980.

Wu, Z. Q., X. D. Han, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. Cancer Chemother Pharmacol, v.68, n.1, Jul, p.87-96. 2011.

Zen, M., M. Canova, *et al.* The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. Autoimmun Rev, v.10, n.6, Apr, p.305-10. 2011.

Zhao, J., L. Huang, *et al.* Oral RDP58 allows CPT-11 dose intensification for enhanced tumor response by decreasing gastrointestinal toxicity. Clin Cancer Res, v.10, n.8, Apr 15, p.2851-9. 2004.

Zhou, J., M. Li, *et al.* A novel strategy for development of glucocorticoids through non-genomic mechanism. Cell Mol Life Sci, v.68, n.8, Apr, p.1405-14. 2010

Zizzo, G. e P. L. Cohen. IL-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to IL-10 and glucocorticoids. J Immunol, v.190, n.10, May 15, p.5237-46. 2013.