

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Rafaela Ribeiro Álvares Batista

**PAPEL DO RECEPTOR DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS (AHR) E DO
METABOLISMO DETRIPTOFANO NO CONTROLE DA DISBIOSE E DA LESÃO
TECIDUAL ASSOCIADA À MUCOSITEINTESTINAL INDUZIDA POR 5-
FLUOROURACIL**

Belo Horizonte
2019

Rafaela Ribeiro Álvares Batista

**PAPEL DO RECEPTOR DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS (AHR) E DO
METABOLISMO DETRIPTOFANO NO CONTROLE DA DISBIOSE E DA LESÃO
TECIDUAL ASSOCIADA À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-
FLUOROURACIL**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.

Belo Horizonte
2019

043

Batista, Rafaela Ribeiro Álvares.

Papel do Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (AHR) e do metabolismo de triptofano no controle da disbiose e da lesão tecidual associada à mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil [manuscrito] / Rafaela Ribeiro Álvares Batista. – 2019.

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.

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

1. Microbiologia. 2. Hidrocarbonetos Aromáticos. 3. Triptofano. 4. Disbiose. 5. Mucosite. 6. Fluoruracila. I. Fagundes, Caio Tavares. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE: Rafaela Ribeiro Álvares Batista
Nº REGISTRO: 2017662083

Às 9 horas do dia 28 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Fabiana Simão Machado (Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB - UFMG), Barbara Maximino Rezende (Faculdade de Enfermagem - UFMG) e o(a) Prof(a). Caio Tavares Fagundes - Orientador(a), para julgar o trabalho final "Papel do Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (AHR) e do metabolismo de triptofano no controle da disbiose e da lesão tecidual associada à mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil" do(a) aluno(a) Rafaela Ribeiro Álvares Batista, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A)**. O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) 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, 28 de fevereiro de 2019.

Dr(a). Fabiana Simão Machado _____

Dr(a). Barbara Maximino Rezende _____

Prof(a). Caio Tavares Fagundes [Orientador(a)] _____

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me iluminar durante esta trajetória; a meus pais, pelo apoio incondicional, incentivo e por nunca medirem esforços para a concretização dos meus sonhos, esta conquista também é de vocês! À minha irmã, Carla, pela força desde o início; ao meu cunhado e a todos da minha família que sempre torceram por mim. Aos amigos do LIMHO, obrigada pelo companheirismo, apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração, vocês tornaram tudo mais leve. Em especial, à Camila e Micheli pela amizade e colaboração; aos Ics: Rafael e Maura, e ao Carlos pelas ajudas nos experimentos; Carla, Brenda e Jordane, parceiras das disciplinas; e um enorme carinho por cada um de vocês: Thai, Ian, Thales, Gabi, Vidy, Fran, Rê, Victor, Simone, Vivi, Paty, Lud e a todos do grupo Immunofar que sempre me ajudaram de alguma forma, principalmente aos colaboradores Fernando e Aninha. Às professoras Dani e Mila, pelo exemplo de profissionais e pela amizade. Ao Caio, enorme gratidão pela oportunidade, dedicação, pelo aprendizado, incentivo e pela grande contribuição para o meu crescimento profissional. Às técnicas que facilitam nosso trabalho com muita eficiência: Gil, Frank e Ilma. Enfim, obrigada a todos que me acompanharam nessa trajetória, cada um de vocês contribuiu para enriquecer esta conquista, que vem sendo construída ao longo desses dois anos.

RESUMO

A mucosite intestinal é um efeito adverso frequente nos pacientes submetidos à quimioterapia, como com o 5-Fluorouracil (5-FU), que pode resultar na interrupção do tratamento. Estudos prévios sugerem a importância dos metabólitos microbianos derivados do aminoácido triptofano (TRP) na atenuação de doenças inflamatórias intestinais (IBD), via ativação do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR). No entanto, ainda não há estudos que correlacionem AHR com a proteção contra mucosite intestinal induzida por quimioterápico. Então, nosso objetivo foi avaliar o papel dos metabólitos de TRP e do AHR na resposta à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais deficientes em AHR (AHR^{-/-}) ou tratados com antagonista desse receptor (α -naftoflavona - α -NF) apresentaram maior susceptibilidade à quimioterapia. A ativação de AHR não mostrou ser dependente do metabolismo do hospedeiro proveniente do TRP, uma vez que animais deficientes em IDO1 (IDO1^{-/-}), enzima que converte TRP em quinurenina (KYN), não apresentaram doença agravada após a quimioterapia. No entanto, o tratamento com ampicilina agravou a doença e promoveu uma disbiose, de maneira semelhante ao documentado nos animais AHR^{-/-} submetidos à quimioterapia. Essas alterações clínicas observadas foram revertidas após a administração de Indol-3-aldeído (Iald), que é um agonista de AHR sintetizado por algumas bactérias ácido-láticas a partir do TRP. Contudo, Iald não interferiu na disbiose observada nos animais tratados com ampicilina. Além disso, não se estabeleceu se Iald influencia na resposta inflamatória, assim como AHR não parece interferir no controle da inflamação intestinal presente nos animais selvagens após administração de 5-FU. Dessa forma, mais análises são requeridas para demonstrar o mecanismo de ativação de AHR por metabólitos microbianos de TRP e suas atividades na regulação da resposta a quimioterápicos. Em conclusão, os resultados do presente trabalho sugerem que bactérias ácido-láticas sensíveis à ampicilina protegem dos efeitos adversos causados pelo quimioterápico, por meio da produção de metabólitos de TRP ligantes de AHR.

Palavras-chave: Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos (Ahr). Metabolismo de Triptofano. Disbiose. Mucosite Intestinal. 5-fluoruracil.

ABSTRACT

Intestinal mucositis is a common adverse effect in patients undergoing chemotherapy, such as with 5-Fluorouracil (5-FU), which may result in discontinuation of treatment. Previous studies have suggested the importance of the microbial metabolites derived from the amino acid tryptophan (TRP) in the attenuation of inflammatory bowel diseases (IBD), through activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). However, studies correlating AHR with protection against chemotherapy-induced intestinal mucositis are scant. Therefore, our objective was to evaluate the role of TRP metabolites and AHR during 5-FU-induced intestinal mucositis. AHR-deficient mice (AHR^{-/-}) or mice treated with this receptor antagonist (α -naphthoflavone - α -NF) were more susceptible to chemotherapy. Activation of AHR was not dependent on host metabolism from TRP, once IDO1-deficient mice (IDO1^{-/-}), enzyme that convert tryptophan (Trp) to kynurenine (KYN), mice were not more susceptible to chemotherapy. However, treatment with ampicillin aggravated the disease and promoted dysbiosis, similarly to what was seen in AHR^{-/-} animals undergoing chemotherapy. These clinical changes were reversed following administration of Indole-3-aldehyde (Iald), which is an AHR agonist synthesized by some lactic-acid bacteria from TRP. However, Iald did not interfere in the dysbiosis observed in the animals treated with ampicillin. In addition, it was not established whether Iald influences the inflammatory response. Hence, AHR does not appear to interfere with the control of the inflammation present in the gut after administration of 5-FU. Thus, further analyzes are required to demonstrate the mechanism of activation of AHR by microbial metabolites of TRP and its activities during the response to chemotherapeutics. In conclusion the findings of the present study suggest that ampicillin-sensitive lactic-acid bacteria protect against the adverse effects caused by chemotherapy by producing AHR-activating TRP metabolites.

Keywords: Aryl Hydrocarbon Receptor (Ahr). Tryptophan metabolism. Dysbiosis. Intestinal Mucositis. 5-fluorouracil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ESTRUTURAS DO 5-FLUOROURACIL E URACIL.....	13
FIGURA 2- MECANISMOS HIPOTETIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO.....	15
FIGURA 3- DISBIOSE E MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU.....	18
FIGURA 4- METABOLISMO DE TRIPTOFANO DERIVADO DA MICROBIOTA	20
FIGURA 5- VIA DE SINALIZAÇÃO DE AHR.....	22
FIGURA 6- DIFERENÇAS ENTRE IEC DE ANIMAIS WT E AHR ^{-/-}	23
FIGURA 7- PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE MUCOSITE INTESTINAL POR QUIMIOTERAPIA E PARÂMETROS AVALIADOS.....	27
FIGURA 8- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1: ESTABELECIMENTO DO MODELO DE QUIMIOTERAPIA COM 5-FU.....	28
FIGURA 9- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2: CARACTERIZAÇÃO TEMPORAL DO MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA.....	29
FIGURA 10- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3: AVALIAÇÃO DO PAPEL DE AHR NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA	30
FIGURA 11- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 4: DETERMINAÇÃO DO PAPEL DE IDO1 NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA.....	30
FIGURA 12- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 5: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NO CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA	31
FIGURA 13- PROTOCOLO EXPERIMENTAL 6: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE IALD PARA ANIMAIS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA E TRATADOS COM ANTIMICROBIANOS.....	32
FIGURA 14- AVALIAÇÃO TEMPORAL DA SUSCEPTIBILIDADE À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR DIFERENTES DOSES DE 5-FU (DOSE-RESPOSTA)	40
FIGURA 15- AVALIAÇÃO DO EFEITO DO QUIMIOTERÁPICO SOBRE PARÂMETROS CLÍNICOS AO LONGO DO TEMPO.	41
FIGURA 16- AVALIAÇÃO TEMPORAL DO COMPRIMENTO INTESTINAL E DO INFLUXO DE LEUCÓCITOS PARA O ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	41
FIGURA 17- ANÁLISE HISTOLÓGICA DO ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA	42
FIGURA 18- AVALIAÇÃO TEMPORAL DO COMPRIMENTO INTESTINAL E DO INFLUXO DE LEUCÓCITOS PARA O ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	43
FIGURA 19- AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU EM ANIMAIS AHR ^{-/-} OU WT TRATADOS COM A-NF	44
FIGURA 20- AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU EM ANIMAIS AHR ^{-/-} OU WT TRATADOS COM A-NF	45
FIGURA 21- AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FACULTATIVAS NA MICROBIOTA DE ANIMAIS COM MUCOSITE INTESTINAL.....	46
FIGURA 22- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA ENZIMA IDO1 NO ÍLEO DE ANIMAIS WT SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA.	47
FIGURA 23- AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE ANIMAIS IDO1 ^{-/-} À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	48
FIGURA 24- ANÁLISE DO EFEITO DO TRATAMENTO COM ANTIMICROBIANOS NO ÍNDICE DE DOENÇA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU.....	50
FIGURA 25- AVALIAÇÃO DA LEUCOPENIA, COMPRIMENTO DO INTESTINO E CONTEÚDO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FACULTATIVAS NO LÚMEN DO ÍLEO DE ANIMAIS COM MUCOSITE	51
FIGURA 26- AVALIAÇÃO DO INFLUXO DE LEUCÓCITOS PARA O ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU E TRATADOS COM AMPICILINA	52

FIGURA 27- A ADMINISTRAÇÃO DE IALD RESTAURA AS ALTERAÇÕES CLÍNICAS PROVOCADAS PELA AMPICILINA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	53
FIGURA 28- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE IALD NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DO LÚMEN DO ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL POR 5-FU E TRATADOS COM AMPICILINA.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
AHR	Receptor de hidrocarbonetos aromáticos
AHR ^{-/-}	Camundongos deficientes em AHR
Ahrr	Gene repressor de AHR
ARNT	Translocador nuclear de AhR
CMC	Carboximetilcelulose
COX2	Ciclo-oxigenase-2
CYP1A1	Enzima do citocromo P450 da família 1, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP1A2	Enzima do citocromo P450 da família 1, subfamília A, polipeptídeo 2
DAMPs	<i>Danger-associated molecular patterns</i> - Padrões Moleculares Associados a Danos
DILI	<i>Drug induced liver injury</i> – lesão hepática induzida por droga
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - ensaio de imunoabsorção enzimática
EPO	Enzima peroxidase eosinofílica
GALTs	Tecidos linfoides associados ao intestino
Iald	Indol-3-aldeído
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i> - Doenças inflamatórias intestinais
IDO1	Indoleamina 2,3-dioxigenase 1
IDO1 ^{-/-}	Camundongos deficientes em IDO1
IECs	<i>Intestinal epithelial cells</i> - células epiteliais intestinais
IgA	Imunoglobulina A
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6

IL-18	Interleucina-18
IL-22	Interleucina-22
IL-33	Interleucina-33
ILC3	Células linfóides inatas do grupo 3
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p	Intraperitoneal
IPA	Indol-3-piruvato
IS	Indoxil-sulfato
KYN	Kynureninas
MPO	Enzima mieloperoxidase
Myd-88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i> - fator de diferenciação mielóide 88
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> - Padrão molecular associado a patógenos
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> - salina tamponada por fosfato
REGIIIγ	<i>Regenerating islet-derived protein 3 gamma</i> - Regeneração da proteína gama 3 derivada de ilhotas
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPL4	<i>Ribosomal Protein L4</i> – Proteína ribossomal L4
RT-qPCR	PCR quantitativa de transcrição reversa
Th17	Células T auxiliares tipo 17
TLRs	Receptores do tipo Toll
Treg	Células T reguladoras
TRP	Triptofano
UFCs	Unidades formadoras de colônias
α-NF	α-naftoflavona
WT	<i>wild type</i> - selvagem

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	5-Fluorouracil e mucosite	13
2.2	Microbiota intestinal, disbiose e mucosite.....	15
2.3	Metabolismo de Triptofano e microbiota intestinal	18
2.4	Metabolismo de Triptofano e AHR.....	20
3	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	Animais.....	25
4.2	Tratamentos	25
4.2.1	Quimioterapia	25
4.2.2	Administração de lald.....	25
4.2.3	Administração de α -NF	26
4.2.4	Administração de antimicrobianos	26
4.3	Protocolos experimentais e parâmetros avaliados.....	26
4.3.1	Parâmetros avaliados nos diversos protocolos experimentais	26
4.3.2	Protocolo experimental 1 - Estabelecimento do modelo de quimioterapia com 5-FU	28
4.3.3	Protocolo experimental 2 - Caracterização temporal do modelo de mucosite intestinal induzida por quimioterapia	28
4.3.4	Protocolo experimental 3 - Avaliação do papel de AHR na mucosite intestinal induzida por quimioterapia	29
4.3.5	Protocolo experimental 4 - Determinação do papel de IDO1 na mucosite intestinal induzida por quimioterapia	30
4.3.6	Protocolo experimental 5 - Avaliação do efeito da administração de antimicrobianos no curso da mucosite intestinal induzida por quimioterapia	31
4.3.7	Protocolo experimental 6 - Avaliação do efeito da administração de lald para animais submetidos à quimioterapia e tratados com antimicrobianos	32
4.4	Determinação do escore clínico	32
4.5	Contagem total de leucócitos no sangue	33
4.6	Avaliação do comprimento do intestino	33

4.7	Análise histológica	33
4.8	Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	34
4.9	Determinação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO).....	35
4.10	Determinação da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)	35
4.11	Composição da microbiota.....	36
4.12	Análise da expressão de <i>Ido1</i>	36
4.13	Análise Estatística.....	37
5	RESULTADOS	39
5.1	Caracterização do modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU	39
5.1.1	Estabelecimento do modelo de quimioterapia com 5-FU.....	39
5.1.2	Caracterização temporal da mucosite intestinal induzida por 5-FU.....	40
5.2	Avaliação do papel de AHR na mucosite intestinal induzida por quimioterapia	43
5.3	Determinação do papel de IDO1 na mucosite intestinal induzida por quimioterapia:	47
5.4	Avaliação do efeito do tratamento com antimicrobianos no curso da mucosite intestinal induzida por quimioterapia.....	48
5.5	Avaliação do efeito da administração de lald para animais submetidos à quimioterapia e tratados com ampicilina	52
6	DISCUSSÃO	55
7	REFERÊNCIAS	61

1 JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal induzida por quimioterápicos, como o 5-FU, acomete diversos pacientes sob tratamento de câncer e pode causar diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, desnutrição, infecções e sepse (Montassier et al., 2015; Fijlstra et al., 2015). Apesar da sua gravidade, uma vez que contribui para o aumento da taxa de hospitalização, da falha no tratamento e da mortalidade, há poucos mecanismos propostos de intervenção na mucosite (Ribeiro et al., 2016).

A microbiota intestinal influencia na fisiopatologia da mucosite por meio da modulação do processo inflamatório, do estresse oxidativo e do sistema imune, além de contribuir para a integridade do epitélio (Fijlstra et al., 2015). Sendo assim, o controle da disbiose constitui uma estratégia interessante para inibir a mucosite. Outro importante papel da microbiota intestinal envolve a síntese de metabólitos, como os produtos do metabolismo do TRP, que são capazes de ativar AHR. Esse receptor exerce tanto um papel antimicrobiano, por meio da transcrição de Interleucina 22 (IL-22) dependente de AHR, que também contribui para a integridade do epitélio do intestino (Monteleone et al., 2011; Julliard et al., 2014), quanto antiinflamatório, pela síntese de IL-10 (Alexeev et al., 2018). Em conjunto, a ativação de AHR pelos metabólitos de TRP resultam na manutenção da homeostase imune intestinal (Lee et al., 2015).

Nesse contexto, observa-se um crescente interesse em se estabelecer a importância fisiológica dos metabólitos do TRP sintetizado pela microbiota sobre o epitélio do intestino, bem como sua função na ativação basal de AHR. A relevância desse receptor na ativação do sistema imune e atenuação de patologias inflamatórias intestinais (Zelante et al., 2013; Islam et al., 2017), torna o AHR um potencial alvo na proteção da mucosite, por controlar a disbiose e a inflamação associada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 5-Fluorouracil e mucosite

O quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) tem sido utilizado com frequência, durante décadas, no tratamento de diversos tumores sólidos, como câncer de mama, estômago, fígado, cabeça, pescoço e colorretal (Zhang N et al., 2008; Seo et al., 2013). A estrutura molecular do 5-FU é análoga à da pirimidina do ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) (Figura 1), o que o torna capaz de alterar o metabolismo de nucleosídeos, sendo incorporados, de forma incorreta, aos ácidos nucleicos, ao invés da uracila ou da timina. O 5-FU também exerce seu efeito citotóxico e morte celular a partir da inibição da timidilato sintase, que bloqueia a síntese de DNA (Zhang N et al., 2008; Zhang W et al., 2012; Hamouda et al., 2017).

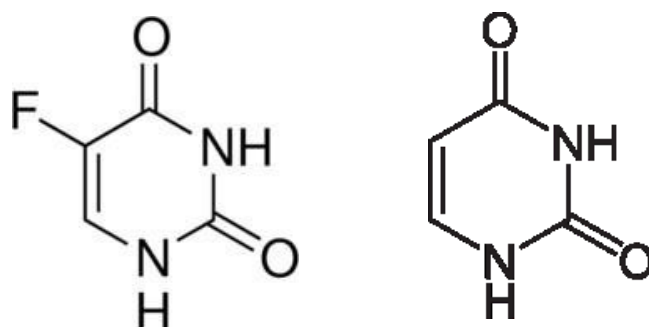


Figura 1- Estruturas do 5-Fluorouracil e uracil. Fonte: (Zhang N et al., 2008).

Apesar da sua efetividade, o uso clínico do 5-FU é dose limitante, uma vez que pode levar, frequentemente, a alterações hematológicas, como leucopenia, neutropenia e trombocitopenia (Singh et al., 2018), além de náusea, vômito e diarreia (Soveri et al., 2014). Outros eventos adversos incluem resistência ao quimioterápico, mucosite (Zhang N et al., 2008) e toxicidade cardíaca (Focaccetti et al., 2015) e hepática (El-Sayyad et al., 2009).

A hepatotoxicidade pode ser causada por alguns metabólitos do 5-FU, que contribuem para o aumento dos efeitos tóxicos não hepáticos, devido ao prejuízo do metabolismo de quimioterápicos e outros medicamentos pelo fígado (Vincenzi et al.,

2018). Isso pode levar a uma redução da dose do quimioterápico ou o adiamento da terapia, bem como resultar em uma morbidade e mortalidade consideráveis (Bahirwani e Reddy, 2014).

Outro efeito adverso grave que pode levar à interrupção do tratamento é a mucosite gastrointestinal, que consiste em lesões na mucosa que podem acometer a cavidade oral, faringe, laringe, o estômago e intestino. Apesar das semelhanças dos mecanismos que desencadeiam a mucosite nesses sítios, as diferenças morfológicas e a taxa de renovação tecidual podem influenciar na resposta à terapia antineoplásica. No intestino, constituído por uma única camada de epitélio colunar, a lesão da mucosa ocorre de forma mais acelerada em relação à mucosa oral, composta por epitélio escamoso estratificado (Sonis, 2004). A maior taxa de renovação celular está associada a uma inflamação e ruptura da função de barreira mais acentuadas (Pedroso et al., 2015). Essas lesões são extremamente dolorosas para o paciente e podem provocar diarreia, constipação intestinal, náusea, vômito, desnutrição, perda de peso e infecções graves. Em geral, a escolha do regime quimioterápico reflete na incidência e gravidade da mucosite (Pedroso et al., 2015; Ribeiro et al., 2016).

A fisiopatologia da mucosite caracteriza-se pela formação inicial de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ativam a maturação das citocinas pró-inflamatórias, como Interleucina-1 beta (IL-1 β), Interleucina-18 (IL-18) e Interleucina-33 (IL-33) por meio da via do inflamassoma. Essas citocinas induzem a liberação de prostaglandinas e óxido nítrico, por meio da ciclo-oxigenase-2 (COX 2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), respectivamente, presentes nas células do intestino, resultando em lesão intestinal. Além disso, o dano direto ao DNA provocado pela quimioterapia produz padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que juntamente com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) provenientes da microbiota, ativam fator nuclear kappa B (NF κ B) via receptores do tipo Toll - fator de diferenciação mielóide 88 (TLR-MyD88), o que resulta na expressão das citocinas pró-inflamatórias citadas anteriormente (IL-1 β , IL-18 e IL-33). Outras quimiocinas são, então, estimuladas e promovem o recrutamento de neutrófilos, que amplificam a geração de ROS e a consequente lesão intestinal (Figura 2) (Ribeiro et al., 2016). Em caso de interrupção da quimioterapia, ocorre a fase de recuperação, na qual há a restauração estrutural e funcional do epitélio do

intestino (Montassier et al., 2015; Vasconcelos et al., 2016). Assim, o desenvolvimento da mucosite está intimamente relacionado à citotoxicidade direta do quimioterápico e apoptose celular, à inflamação e à microbiota intestinal (Hamouda et al., 2017).

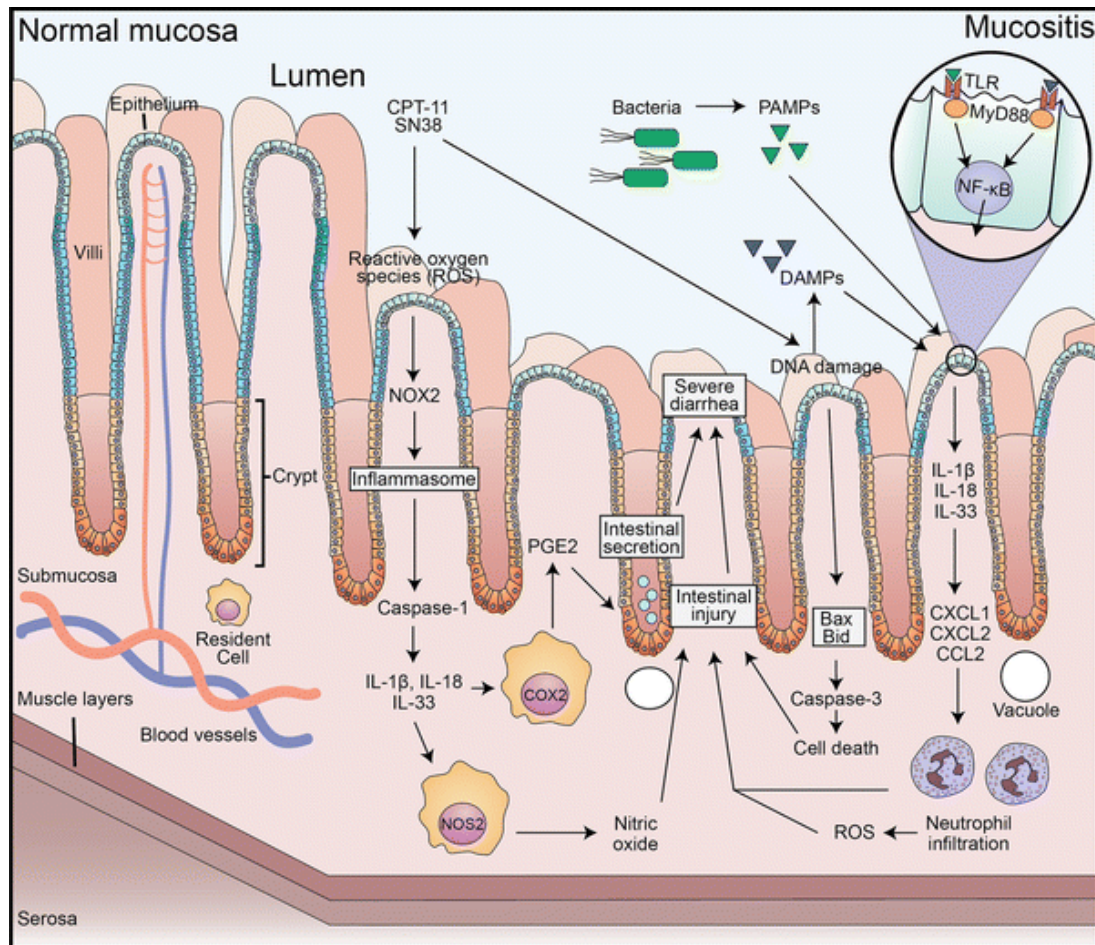


Figura 2- Mecanismos hipotetizados para o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por quimioterápico. A quimioterapia induz apoptose celular por diferentes vias. A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ativa o inflamassoma e a maturação dependente de caspase-1 das citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33. Essas citocinas induzem a expressão de COX 2 e iNOS pelas células, que estimulam a liberação de prostaglandinas e óxido nítrico, respectivamente, resultando em lesão intestinal. Além disso, o dano direto ao DNA provocado pela quimioterapia produz DAMPs, que juntamente com os PAMPs provenientes da microbiota, ativam NF κ B via TLR-MyD88, o que resulta na expressão das citocinas pró-inflamatórias citadas anteriormente (IL-1 β , IL-18 e IL-33). Outras quimiocinas são, então, estimuladas e promovem o recrutamento de neutrófilos que amplificam a geração de ROS e a consequente lesão intestinal. Fonte: (Ribeiro et al., 2016).

2.2 Microbiota intestinal, disbiose e mucosite

As superfícies mucosas expostas, como pele, boca, pulmão e intestino são colonizadas por um conjunto de microrganismos constituído principalmente por bactérias, mas também podem estar presentes fungos, vírus, protozoários e

archaeas, o qual é denominado microbiota (Steinmeyer et al., 2015; Rooks e Garrett, 2016). Essa colonização inicia-se logo após o nascimento e torna-se diversificada e abundante a partir do contato com o ambiente externo (Fagundes et al., 2011). Diversos fatores influenciam a composição da microbiota como a genética, idade, sexo e sistema imune do hospedeiro, além de fatores ambientais, como a dieta e o uso de antibióticos e de outros medicamentos (Cani e Knauf, 2016).

Apesar das diferenças interindividuais e da variação da microbiota ao longo do intestino, a microbiota intestinal é composta predominantemente por bactérias estritamente anaeróbias, que pertencem, principalmente, a quatro filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactérias e Actinobactérias. (Rooks e Garrett, 2016; Zuo e Ng, 2018). Dentre eles, o filo Firmicutes, composto por bactérias Gram-positivo, é o mais abundante e diverso no intestino, no qual está incluído o gênero *Lactobacillus*, predominante em camundongos. As Proteobactérias são constituídas por bactérias Gram-negativo, incluindo a família Enterobacteriaceae, que pode sofrer expansão durante as doenças inflamatórias intestinais (Winter e Bäumlner, 2014; Vrakas et al., 2017; Zuo e Ng, 2018).

Considerada a mais densa do organismo, a microbiota intestinal desempenha diversas funções associadas à nutrição, metabolismo, desenvolvimento da estrutura intestinal, proteção contra patógenos e regulação imune (Shimada et al., 2013; Wischmeyer et al., 2016; Li et al., 2017). A integridade do epitélio intestinal depende de um conjunto de elementos relacionados à microbiota, como estímulo à síntese de proteínas antimicrobianas (Regeneração da proteína gama 3 derivada de ilhotas - REGIIIγ), secreção de Imunoglobulina A (IgA) e muco (Molloy, 2013; Ramanan e Cadwell, 2016). Além disso, a microbiota estimula a maturação dos tecidos linfoides associados ao intestino (GALTs), a ativação de células T na mucosa intestinal (Fagundes et al., 2011) e o desenvolvimento de células efetoras T auxiliares, como tipo 17 (Th17) e células T reguladoras (Treg) (Mortha et al., 2014; Lin e Zhang, 2017). A microbiota também pode modular a ativação de fator nuclear kappa B (NF- κ B), para atenuar a inflamação intestinal (Zuo e Ng, 2018). A habilidade do sistema imune em diferenciar os microrganismos endógenos e patogênicos, permite a tolerância à microbiota residente, a partir da indução de células Treg, por exemplo, e promove a resposta inflamatória contra os patógenos (Fagundes et al., 2011; Mortha et al., 2014).

O desequilíbrio da microbiota, denominado disbiose, compreende a alteração tanto da composição taxonômica quanto da capacidade metabólica da microbiota (Montassier et al., 2015). Isso resulta em diversas implicações para a saúde do hospedeiro, como síndrome metabólica, doenças inflamatórias intestinais (IBD), esclerose múltipla e depressão (Li et al., 2017).

A ruptura da barreira epitelial, decorrente da apoptose e hipoproliferação celular induzidas por quimioterápico, promove uma disbiose, caracterizada principalmente pela expansão de enterobactérias (Menezes-Garcia, 2015). Essas bactérias Gram-negativo levam à inflamação secundária, que contribui para o desenvolvimento da mucosite (Figura 3) (Hamouda et al., 2017). Além da diminuição da riqueza e diversidade da microbiota intestinal após o tratamento com 5-FU (Li et al., 2017), a importância da microbiota na patogênese da doença é evidenciada pela atenuação dos sintomas, dos parâmetros inflamatórios e pela reversão da lesão, após a administração de probióticos em modelo murino (Justino et al., 2014).

Além do processo inflamatório, a disbiose pode influenciar no desenvolvimento da mucosite intestinal por meio do comprometimento da modulação do estresse oxidativo, da permeabilidade intestinal, da composição da camada de muco e reparo epitelial, além da resistência contra estímulos nocivos e imunorregulação (Fijlstra et al., 2015). O desenvolvimento da resposta inflamatória dependente da colonização intestinal foi evidenciado pela ausência de inflamação em animais isentos de germe, a qual é revertida após a reintegração da microbiota (Souza et al., 2004, Menezes-Garcia, 2015). Outros estudos também mostram que o controle da microbiota por meio do uso de antibióticos ou probióticos resulta em uma atenuação da lesão e da inflamação. Isso corrobora para a importância da microbiota na patogênese da mucosite induzida por 5-FU (Pedroso et al., 2015; Hamouda et al., 2017).

Por outro lado, a microbiota também atua no controle da resposta inflamatória excessiva e na resolução da inflamação a partir da síntese de mediadores (Souza et al., 2007). Os produtos do metabolismo microbiano, como os ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) e os ligantes de AHR desempenham papel importante na regulação do sistema imune (Zelante, 2014; Pedroso et al., 2015).

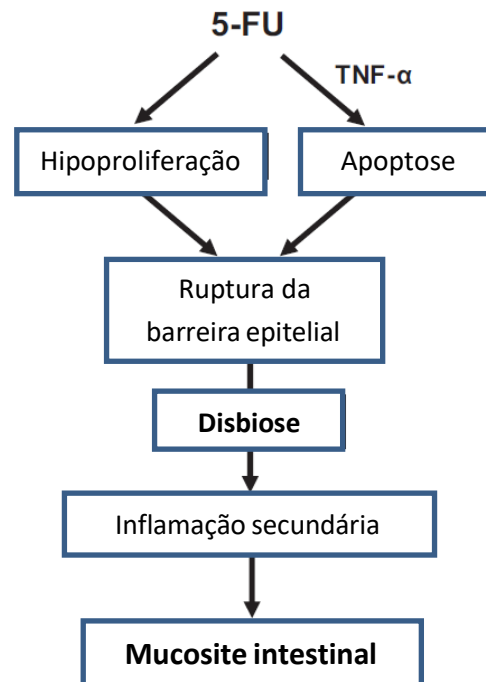


Figura 3- Disbiose e mucosite intestinal induzida por 5-FU. Fonte: Adaptado de Hamouda et al., (2017).

2.3 Metabolismo de Triptofano e microbiota intestinal

A microbiota sintetiza diversos metabólitos que atuam como moléculas sinalizadoras capazes de alterar a expressão gênica do hospedeiro (Schroeder e Bäckhed, 2016) e exercer funções de fonte energética, síntese de vitaminas e mediadores imunes (Blacher et al., 2017). Esses metabólitos atuam por meio de diferentes mecanismos, dos quais destaca-se a ativação de receptores específicos, dentre eles o AHR, que tem despertado interesse devido ao importante papel na manutenção da homeostase imune do intestino (Zelante et al., 2013; Roager e Licht, 2018).

Dentre os ligantes de AHR estão os metabólitos de TRP derivados da microbiota intestinal, os quais são correlacionados, em vários estudos, com a resistência contra a colonização de patógenos e com a proteção contra doenças inflamatórias intestinais (Zelante et al., 2013; Shimada et al., 2013). O TRP é um aminoácido essencial proveniente do catabolismo de proteínas da dieta, o qual pode ser convertido a diversos metabólitos pela microbiota. Os metabólitos gerados são, então, absorvidos pelo epitélio intestinal e podem desempenhar funções anti-inflamatórias e anti-oxidantes ou citotóxicas (Figura 4) (Roager e Licht, 2018).

A produção de indol por algumas bactérias requer a enzima triptofanase presente em diversas espécies de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo que compõem a microbiota intestinal (Lee et al., 2015). O indol, por sua vez, pode ser metabolizado no fígado e gerar os derivados de indol, incluindo o indoxil-sulfato (IS), o qual apresenta efeitos tóxicos em altas concentrações (Roager e Licht, 2018). Dentre os demais metabólitos de TRP, destaca-se o lald, que pode ser sintetizado por *Lactobacillus reuteri* e promover resistência contra a colonização por *Candida albicans* e proteção da mucosa contra inflamação via ativação de AHR (Zelante et al., 2013).

No entanto, situações de disbiose ou modificação na dieta induzem uma alteração do metabolismo microbiano e das funções desses metabólitos na fisiologia do hospedeiro (Celiberto et al., 2018). O metabolismo do TRP é significativamente alterado durante a colite, em que se observa uma redução dos níveis séricos de indol, Indol-3-piruvato (IPA) e lald em modelo animal e em pacientes (Alexeev et al., 2018). O tratamento com esses metabólitos melhora a função de barreira epitelial, o que limita a lesão do intestino e a inflamação em camundongos (Shimada et al., 2013; Swimm et al., 2018; Alexeev et al., 2018).

A síntese dos metabólitos pela microbiota também encontra-se reduzida após a quimioterapia (Swimm et al., 2018), o que sugere uma diminuição desses metabólitos durante a mucosite induzida por quimioterápicos. Assim, a administração oral de lald poderia atenuar a lesão da mucosa intestinal e a produção de citocinas inflamatórias, via ativação de AHR, como demonstrado em modelo de IBD (Alexeev et al., 2018).

Além do metabolismo microbiano, o TRP pode ser metabolizado pelas enzimas do hospedeiro, sendo que a via das kinureninas (KYN) é mais comumente ativa no trato gastrointestinal. O metabolismo do hospedeiro converte o TRP em KYN via Indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1), que é uma enzima envolvida na supressão da inflamação e no desenvolvimento de células Treg (Zelante et al., 2013). Em pacientes com IBD, observa-se uma redução significativa dos níveis séricos de TRP e um aumento de KYN, acompanhado da maior atividade de IDO1, o que indica ativação da via do hospedeiro no metabolismo de TRP (Nikolaus et al., 2017).

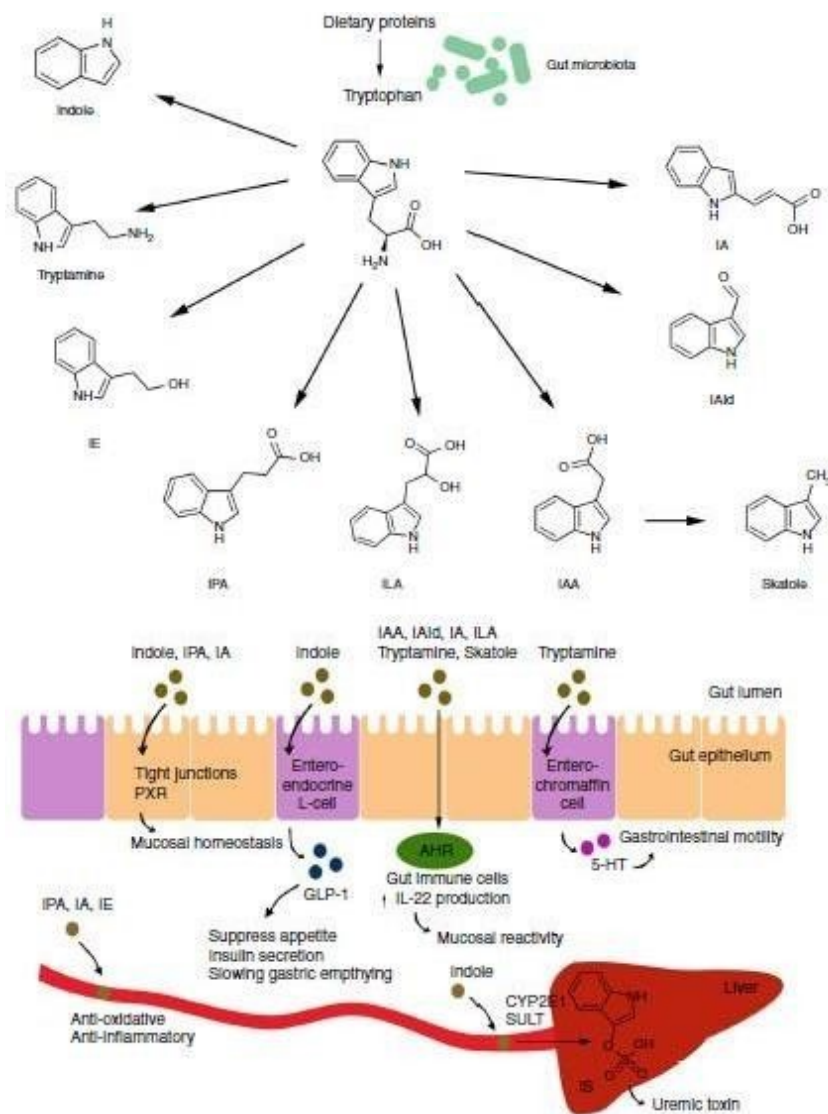


Figura 4- Metabolismo de Triptofano derivado da microbiota. O TRP proveniente do catabolismo de proteínas da dieta é convertido a diversos metabólitos pela microbiota intestinal. Os metabólitos de TRP desempenham funções importantes para a fisiologia do hospedeiro, por meio de diferentes mecanismos. Alguns desses metabólitos, como o lald, são ligantes de AHR, que são expressos nas ILCs. A ativação de AHR induz a produção de IL22, que contribui para a integridade do epitélio intestinal. Outros metabólitos, como indol e triptamina, também regulam a síntese de hormônios entéricos, além de promover homeostase imune da mucosa. O indol pode ainda ser metabolizado no fígado a IS, que é tóxico em altas concentrações. Após serem absorvidos, alguns desses metabólitos exercem funções anti-inflamatórias e anti-oxidativas. Fonte: (Roager e Licht, 2018).

2.4 Metabolismo de Triptofano e AHR

Diversos metabólitos de TRP desempenham funções essenciais para o hospedeiro via ativação de AHR. O AHR é um fator de transcrição dependente de ligante, amplamente expresso em células imunes, epiteliais e algumas células tumorais, presentes em regiões de mucosas, como pele, pulmão e intestino (Rooks

e Garrett, 2016; Metidji et al., 2018). Os ligantes de AHR incluem xenobióticos, como a dioxina (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), que são ligantes exógenos, e ligantes endógenos derivados de componentes da dieta e do metabolismo de TRP, além de eicosanoides, como a lipoxina A4. A estrutura do AHR contém um domínio predito como de ligação ao ligante (Figura 5), que possibilita o reconhecimento dessa variedade de moléculas naturais e sintéticas pelo receptor (Machado et al., 2006; Monteleone et al., 2011; Zelante, et al., 2014; Metidji et al., 2018). Após a interação com o ligante, o AHR no citosol transloca para o núcleo, onde se associa com o translocador nuclear de AHR (ARNT). O heterodímero AHR/ARNT formado se liga a uma sequência consenso de DNA nas regiões promotoras e inicia a transcrição de genes, incluindo aqueles que codificam as enzimas do citocromo P450, como CYP1A1 e CYP1A2, envolvida no metabolismo de toxinas (Takamura et al., 2010; Hubbard et al., 2015) e de ligantes de AHR, como mecanismo de regulação negativa da ativação desse receptor (Peres et al., 2017; Schiering et al., 2018; Metidji et al., 2018). Outro modulador da atividade de AHR é o gene repressor de AHR (*Ahrr*), cuja transcrição é induzida após a ativação desse receptor (Peres et al., 2017). Além da transcrição gênica modulada por AHR diretamente pelo ligante, a ativação desse receptor pode estar associada à presença de mediadores, como aqueles envolvidos na resposta inflamatória, o que inclui a regulação de genes expressos durante a inflamação (Interleucina 6 - IL-6, IL-22) e a angiogênese (Hubbard et al., 2015).

A ativação de AHR por metabólitos de TRP promove diversos efeitos benéficos no sistema imune e em células não hematopoiéticas. Nas células imunes intestinais, o AHR modula as respostas tanto inata quanto adaptativa, por meio da diferenciação de células Treg e de células B e da liberação de citocinas, como a IL-22. Além de promover a homeostase das células epiteliais, a IL-22 leva à proliferação e síntese de peptídeos antimicrobianos (Monteleone et al., 2011; Julliard et al., 2014; Hubbard et al., 2015). O Iald, produzido por lactobacilos ou administrado por via oral, ativa AHR e induz a expressão de IL-22 pelas células linfóides inatas do grupo 3 (ILC3), o que contribui para a manutenção da integridade do epitélio do intestino e para a resistência contra infecções fúngicas (Zelante et al., 2013; Islam et al., 2017). A função de barreira epitelial também pode ser promovida por mecanismo independente da liberação de IL-22, por meio da ativação direta de células epiteliais intestinais (IECs). Nas IECs, o AHR também modula a diferenciação de células-

tronco (Figura 6), que juntamente com a regulação de citocinas pró-inflamatórias, previne contra a tumorigênese colorretal (Díaz-Díaz et al., 2016; Metidji et al., 2018). Assim, a deficiência de AHR aumenta a susceptibilidade a doenças inflamatórias intestinais (Zelante et al., 2013), à síndrome metabólica (Natividad et al., 2018) e ao desenvolvimento de tumores no cólon (Díaz-Díaz et al., 2016).

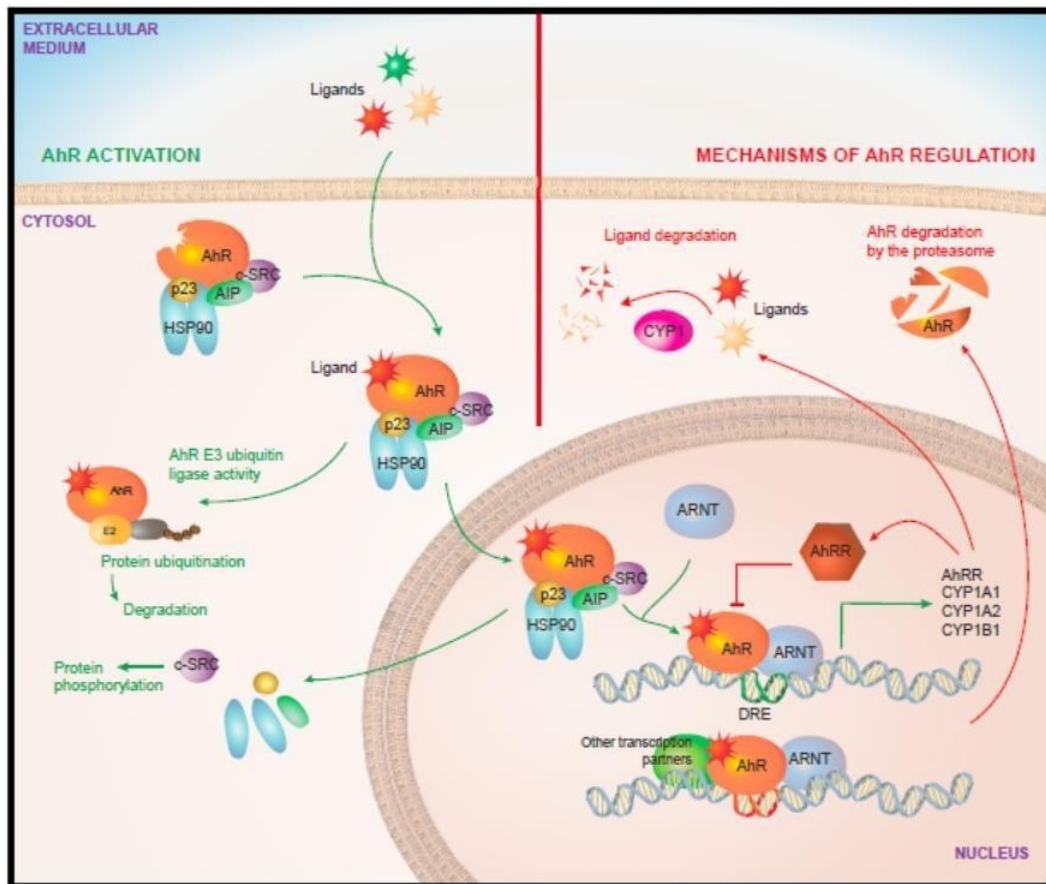


Figura 5- Via de sinalização de AHR. Após a ativação de AHR mediada por ligantes, o AHR presente no citosol da célula transloca para o núcleo, onde induz a transcrição gênica. Dentre esses genes incluem *Cyp1* e *Ahrr*, que regulam negativamente a atividade de AHR, a partir da degradação dos ligantes ou inibição do complexo AHR/ARNT, respectivamente. Fonte: (Gutiérrez-Vázquez e Quintana, 2018).

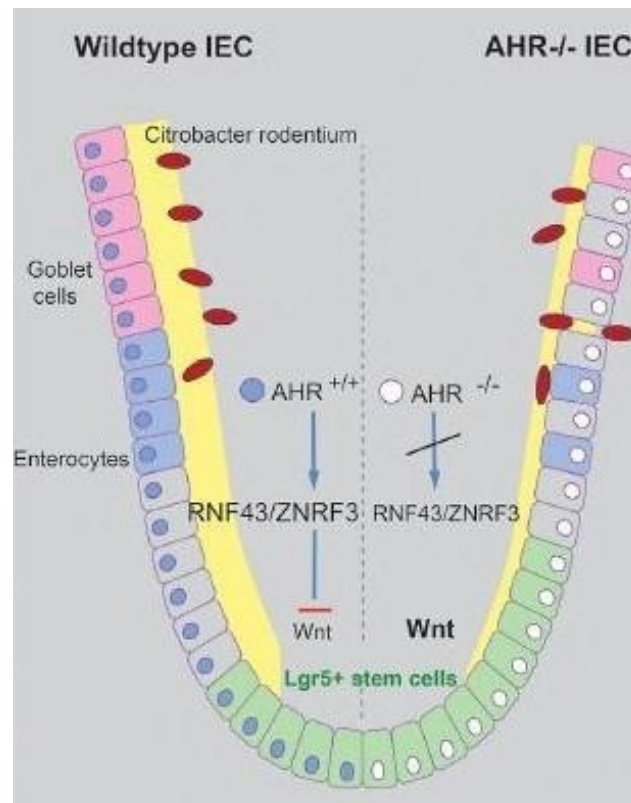


Figura 6- Diferenças entre IEC de animais WT e AHR^{-/-}. A deficiência de AHR nas IEC promove perda da integridade do epitélio, que resulta em invasão da mucosa por patógenos oportunistas e inflamação. As células-tronco da cripta também aumentam a proliferação, devido a ausência de regulação da diferenciação dessas células por AHR, o que culmina no desenvolvimento de tumor. Fonte: Adaptado de Metidji et al., (2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Determinar o papel do metabolismo de TRP e de AHR na resposta à mucosite intestinal induzida por 5-FU.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um modelo de quimioterapia com 5-FU em camundongos que permita a sobrevivência dos animais tratados por longos períodos de tempo;
- Caracterizar o modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU a partir da análise do índice de atividade de doença e de parâmetros inflamatórios e histológicos;
- Avaliar se há alteração da população de bactérias ácido-láticas e de enterobactérias durante a mucosite intestinal induzida por 5-FU;
- Avaliar se animais AHR^{-/-} apresentam alteração na susceptibilidade à mucosite induzida pela quimioterapia;
- Analisar se o tratamento de animais WT com α -NF, um antagonista de AHR, resulta em alteração na susceptibilidade à mucosite intestinal induzida por quimioterapia;
- Determinar se animais IDO1^{-/-} apresentam alteração na susceptibilidade à mucosite induzida pela quimioterapia;
- Avaliar se o tratamento com diferentes antimicrobianos interfere na susceptibilidade à mucosite induzida por quimioterapia de animais selvagens;
- Avaliar se a administração de um ligante de AHR para animais que receberam antimicrobianos resulta numa susceptibilidade à mucosite induzida por quimioterapia semelhante à de animais que não receberam antimicrobianos.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Os procedimentos experimentais realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA - protocolo 275/2017). Camundongos C57BL/6, fêmeas com 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e fêmeas AHR^{-/-} foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, onde os animais foram mantidos. Os camundongos foram alojados em microisoladores (Alesco) autoclavados com cama de maravalha, e com livre acesso à ração e água filtrada, sendo armazenados em estantes ventiladas individualmente e com temperatura controlada (23°C), localizada em uma sala com ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.2 Tratamentos

4.2.1 Quimioterapia

O protocolo de indução da mucosite intestinal com o quimioterápico 5-FU consistiu em uma dose diária administrada durante 3 dias consecutivos pela via intraperitoneal (i.p). Inicialmente, foram utilizadas as doses de 37,5; 75 e 150 mg/kg/d. Os experimentos subsequentes utilizaram a dose de 75 mg/kg/d.

4.2.2 Administração de lald

Animais WT foram tratados diariamente com lald (100 mg/Kg/d) por gavagem a partir do dia inicial da quimioterapia e durante todo o período experimental, conforme descrito por Swimm et al., 2018. Foram administrados 200 µL da suspensão de lald em carboximetilcelulose (CMC 0,5% p/v em água filtrada) por animal.

4.2.3 Administração de α -NF

Animais WT foram tratados com α -NF (10 mg/kg/d) (Jang et al., 2007; Barreiro et al., 2011) em dimetilformamida - DMF 10% v/v em PBS, sendo administrados 100 μ L via i.p a partir do dia inicial da quimioterapia e durante todo o período experimental.

4.2.4 Administração de antimicrobianos

Animais WT foram tratados com ampicilina (1,0 g/L) (Zelante et al., 2013) ou ciprofloxacino (0,2 g/L) ou vancomicina (0,5 g/L) na água de beber (Fagarasan et al., 2002) a partir do dia inicial da quimioterapia e durante todo o período experimental. O espectro de ação da ampicilina, do ciprofloxacino e da vancomicina compreendem bactérias Gram-positivo (bactérias ácido-láticas), Gram-negativo (enterobactérias) e cocos Gram-positivo (*Clostridium*), respectivamente. Geralmente, bactérias ácido-láticas são sensíveis à ampicilina e resistentes à vancomicina e ao ciprofloxacino (Nawaz et al., 2011).

4.3 Protocolos experimentais e parâmetros avaliados

4.3.1 Parâmetros avaliados nos diversos protocolos experimentais

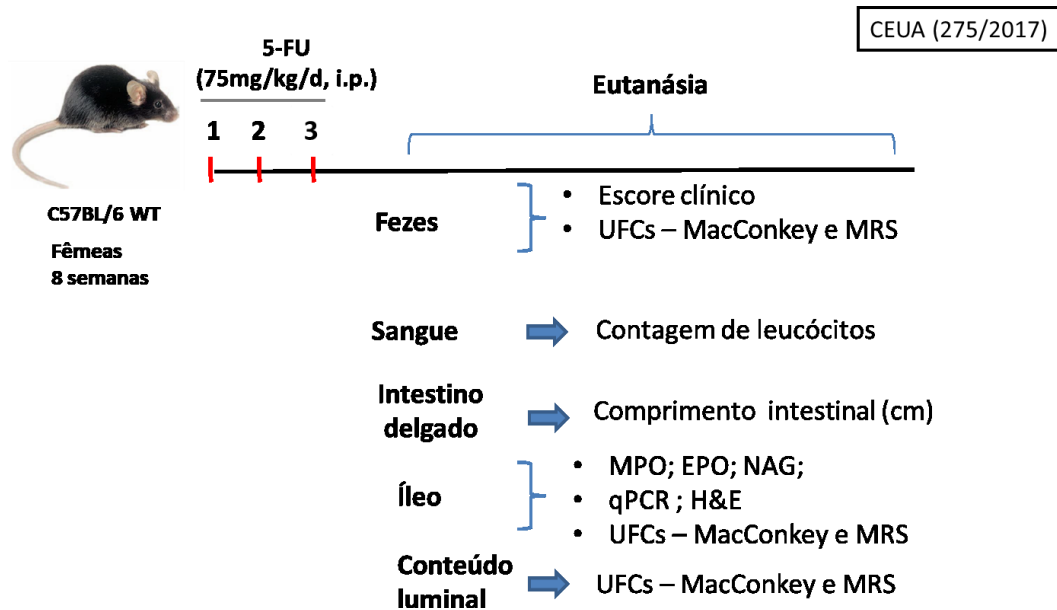


Figura 7- Protocolo experimental de indução de mucosite intestinal por quimioterapia e parâmetros avaliados. Determinação de parâmetros clínicos, inflamatórios e microbiológicos a partir de amostras de fezes, sangue e íleo.

Nos vários experimentos realizados, foram analisados diferentes parâmetros, como esquematizado na Figura 7. Antes de iniciar o tratamento com o quimioterápico, os animais foram pesados para se determinar, posteriormente, a variação de peso corporal em momentos estabelecidos. Nos tempos previstos, também foram coletadas as fezes para a avaliação do escore clínico e o cultivo em meios sólidos, o qual foi executado em alguns experimentos. As análises subsequentes procederam a partir de amostras coletadas durante a eutanásia, sendo o sangue para a contagem de leucócitos e o intestino delgado para obtenção da medida do comprimento total e retirada do íleo. Fragmentos de íleo foram utilizados para realizar histologia e para o cultivo em meios sólidos, que inclui o conteúdo luminal removido. Outros fragmentos foram separados e armazenados a -20°C para os ensaios de MPO, EPO, NAG e qPCR. Os parâmetros avaliados estão detalhados a seguir:

- i. A taxa de sobrevivência, monitorada diariamente por 30 dias após o início da quimioterapia;

- ii. O escore clínico dos animais, analisados de acordo com a consistência e a presença de sangue oculto nas fezes, perda de peso corporal e sinais de morbidade
- iii. Contagem de leucócitos no sangue utilizando câmara Neubauer;
- iv. Verificação do comprimento do intestino, para avaliação de lesão induzida pela mucosite, medido com auxílio de uma régua;
- v. Análise histopatológica de cortes histológicos do íleo corados com H&E;
- vi. O influxo de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o íleo, em homogenato de tecidos inflamados, por meio da determinação da atividade de enzimas específicas para cada uma das populações referidas, mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG);
- vii. Avaliação da composição da microbiota presente nas fezes, conteúdo luminal e íleo, pelo cultivo em meios sólidos;
- viii. A cinética da expressão do gene *Ido1* envolvido na ativação de AHR por PCR quantitativa de transcrição reversa (RT-qPCR).

4.3.2 Protocolo experimental 1 – Estabelecimento do modelo de quimioterapia com 5-FU

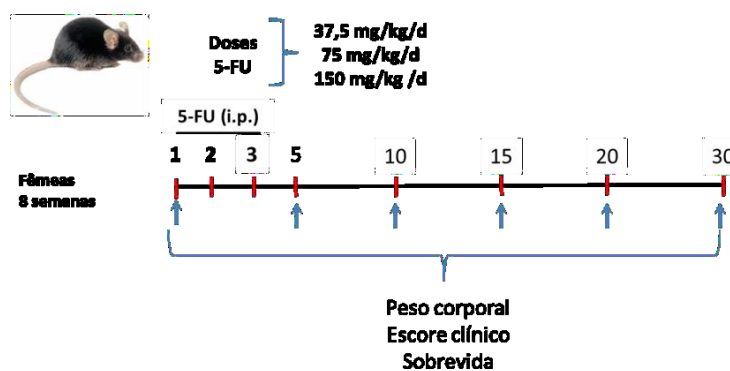


Figura 8- Protocolo experimental 1: Estabelecimento do modelo de quimioterapia com 5-FU. Avaliação da susceptibilidade à quimioterapia utilizando as doses de 37,5 mg/kg, 75 mg/kg ou 150 mg/kg de 5-FU (i.p.; 3 dias). Os parâmetros descritos foram avaliados nos tempos indicados pelas setas.

4.3.3 Protocolo experimental 2 – Caracterização temporal do modelo de mucosite intestinal induzida por quimioterapia

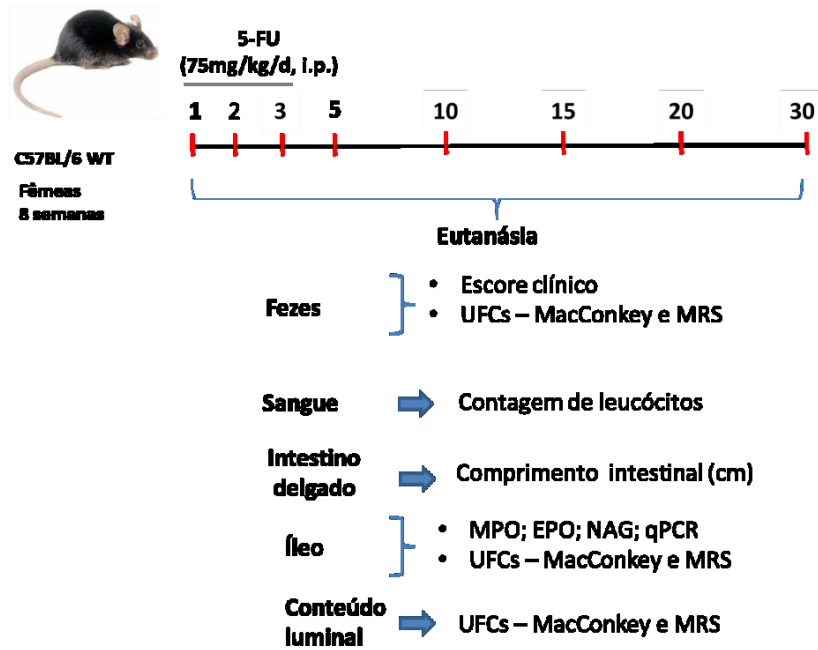


Figura 9- Protocolo experimental 2: Caracterização temporal do modelo de mucosite intestinal induzida por quimioterapia. Análise de parâmetros clínicos, inflamatórios e microbiológicos em amostras de fezes, sangue e intestino delgado em animais WT tratados com 5-FU (75 mg/kg/dia; i.p; 3 dias) nos tempos indicados em negrito.

4.3.4 Protocolo experimental 3 – Avaliação do papel de AHR na mucosite intestinal induzida por quimioterapia

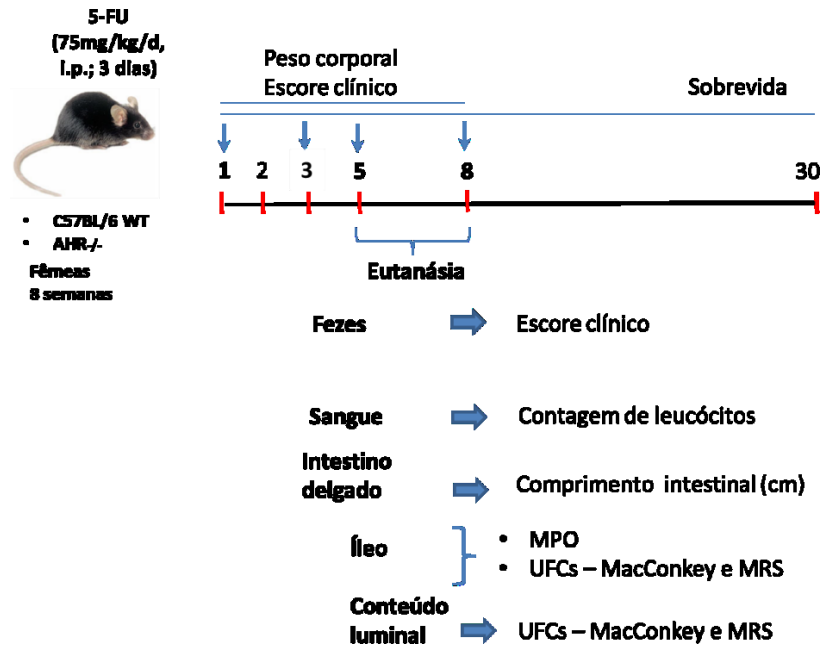


Figura 10- Protocolo experimental 3: Avaliação do papel de AHR na mucosite intestinal induzida por quimioterapia. Análise de parâmetros clínicos, inflamatórios e microbiológicos em amostras de fezes, sangue e intestino delgado após indução da mucosite intestinal em animais AHR^{-/-} ou WT tratados com α -NF vs. WT tratados com veículo. O peso e escore clínico foram analisados nos tempos indicados pelas setas.

4.3.5 Protocolo experimental 4 – Determinação do papel de IDO1 na mucosite intestinal induzida por quimioterapia

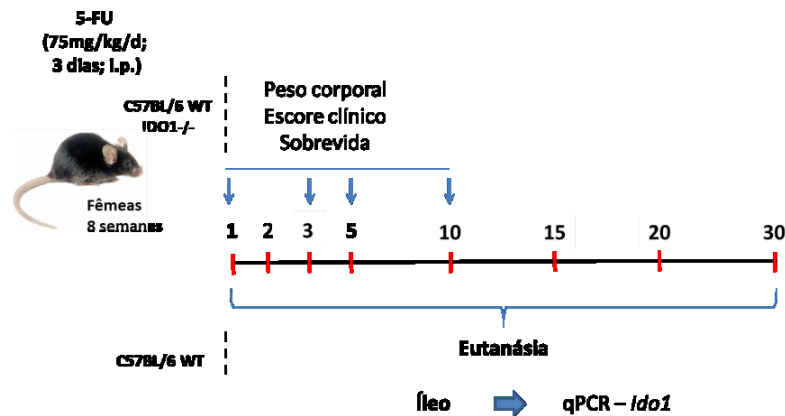


Figura 11- Protocolo experimental 4: Determinação do papel de IDO1 na mucosite intestinal induzida por quimioterapia. Análise da expressão de *Ido1* no íleo de animais WT e da susceptibilidade de animais IDO1^{-/-} vs. WT submetidos ao tratamento com 5-FU (75 mg/kg/dia; i.p; 3 dias) nos tempos destacados em negrito. O peso, escore clínico e taxa de sobrevivência foram analisados nos tempos indicados pelas setas.

4.3.6 Protocolo experimental 5 – Avaliação do efeito da administração de antimicrobianos no curso da mucosite intestinal induzida por quimioterapia.

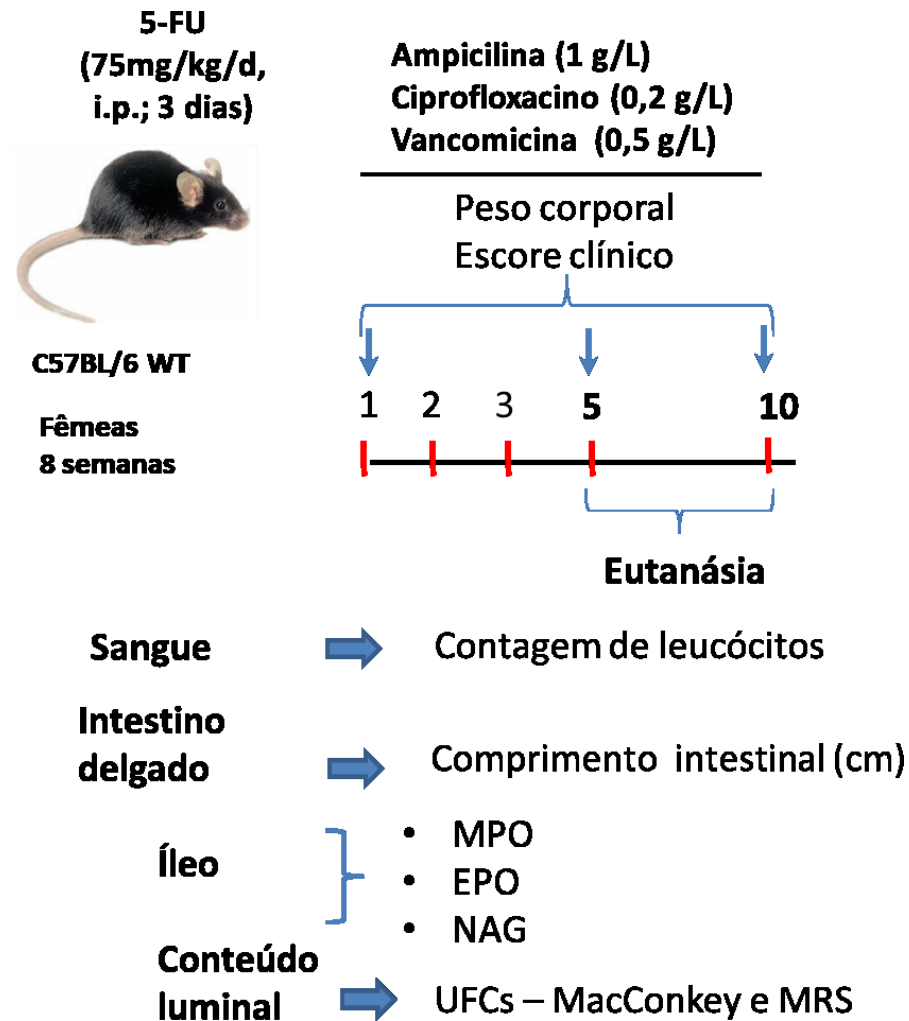


Figura 12- Protocolo experimental 5: Avaliação do efeito da administração de antimicrobianos no curso da mucosite intestinal induzida por quimioterapia. Animais WT submetidos à administração de 5-FU (75 mg/kg/dia; i.p; 3 dias) foram tratados com ampicilina (1 g/L) ou ciprofloxacino (0,2 g/L) ou vancomicina (0,5 g/L) na água de beber durante todo o protocolo experimental. Amostras de fezes, sangue e intestino delgado foram analisadas nos tempos indicados.

4.3.7 Protocolo experimental 6 – Avaliação do efeito da administração de lald para animais submetidos à quimioterapia e tratados com antimicrobianos

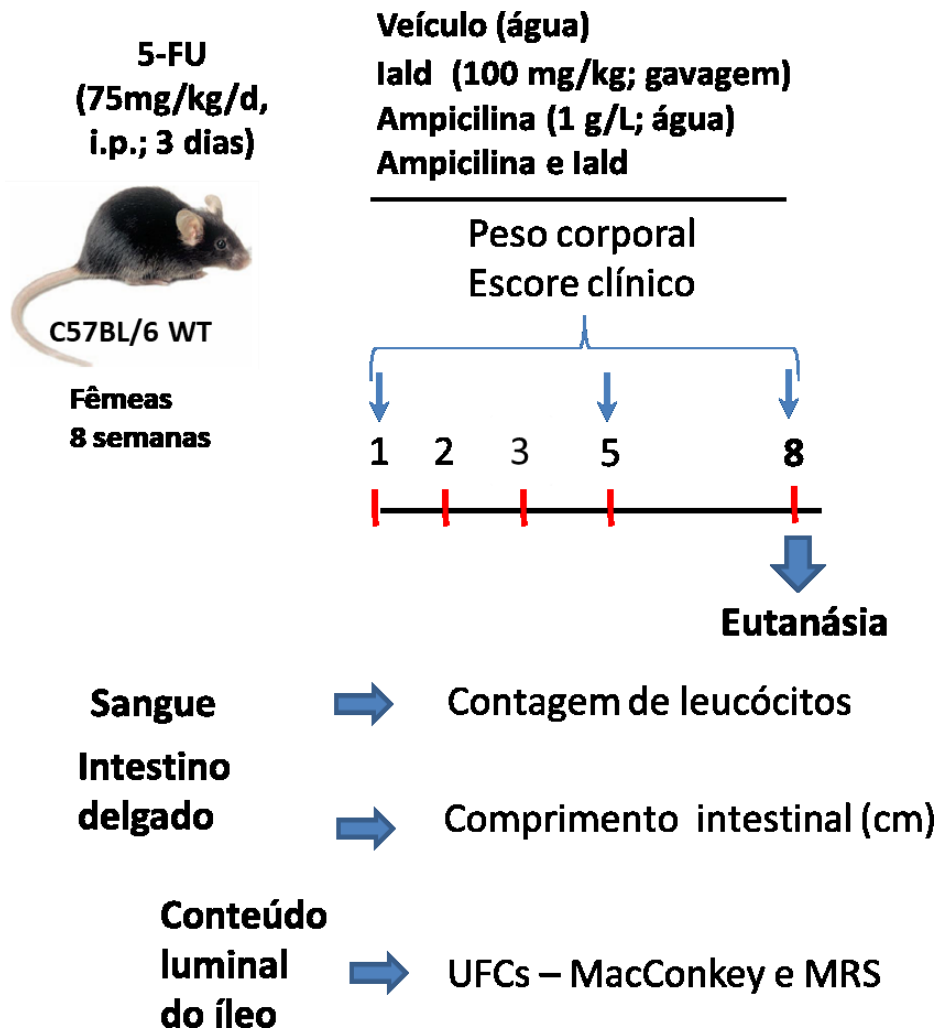


Figura 13- Protocolo experimental 6: Avaliação do efeito da administração de lald para animais submetidos à quimioterapia e tratados com antimicrobianos. Animais submetidos à administração de 5-FU (75 mg/kg/dia; i.p; 3 dias) foram tratados com veículo ou ampicilina (1 g/L) e receberam ou não lald (100 mg/kg). Amostras de fezes e intestino delgado foram analisadas no tempo indicado da eutanásia. O peso e escore clínico foram avaliados nos tempos indicados pelas setas.

4.4 Determinação do escore clínico

A análise do escore clínico dos animais é baseada na consistência fecal e presença de sangue oculto nas fezes, por meio do teste de papel guáiac (Feca/cult-

INLAB), além da avaliação da perda percentual de peso corporal e de sinais de morbidade (VIEIRA et al 2009), conforme a tabela a seguir:

ESCORE	Fezes	Sangue oculto	Perda de peso	Morbidade
0	normal	ausente	até 5%	ausente
1	pastosa	traços	até 10%	pelos arrepiados
2	líquida	presente	até 15%	pelos arrepiados e postura arqueada
3			até 20%	pelos arrepiados, postura arqueada e inatividade
4			superior a 20%	
TOTAL (0-11)				

(Adaptado de VIEIRA et al 2009).

4.5 Contagem total de leucócitos no sangue

A contagem total de leucócitos circulantes foi realizada a partir da coleta de 10 μ L de sangue dos animais, seguida da adição de 90 μ L do corante Turkey. As células foram contadas em câmara de Neubauer e visualizadas em microscópio óptico.

4.6 Avaliação do comprimento do intestino

O comprimento do intestino delgado, que compreende a distância entre o piloro gastroduodenal e o óstio ileal, foi determinado com auxílio de uma régua logo após ser removido. O resultado é expresso em centímetros. Posteriormente, o terço distal do íleo foi retirado, para as análises seguintes.

4.7 Análise histológica

Amostras do intestino delgado foram removidas e, de forma cuidadosa, foram cortadas longitudinalmente, enroladas com auxílio de um palito e, em seguida amarradas com uma linha. As amostras então foram fixadas em solução de formol a 10% em tampão fosfato pH=7,4 durante 24h. Posteriormente, os tecidos foram desidratados gradualmente em etanol (70%, 85%, 95% absoluto I, II, III durante 30 minutos cada); embebidos em xilol (2 ciclos de 20 min); parafina líquida (3 banhos de 30 minutos) e incluídos em blocos de parafina (Paraplast Sigma). Após a inclusão, os tecidos foram cortados em micrótomo, com espessura de 5 μ m, fixados em lâminas histológicas previamente identificadas, com posterior desparafinização (xilol, álcool absoluto, álcool 90, 80, 70%, água) e coloração em hematoxilina (90 segundos) - eosina (90 segundos), conforme protocolo. As lâminas então, foram novamente desidratadas e, em seguida, diafanizadas e montadas com Entelan para análise em microscópio óptico. A avaliação histopatológica foi baseada segundo os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório de mononucleares e polimorfonucleares (0 a 4: ausente, leve, moderado, intenso, muito intenso); arquitetura das vilosidades e criptas (0 a 2: sem alterações, perda parcial, perda total da arquitetura); edema (0 a 1: ausente, presente); erosão (0 a 3: ausente, presente, erosão e ulceração, ulceração); hemorragia (0 a 2: ausente, moderada, intensa); hiperemia (0 a 1: ausente, presente). O escore máximo é 13.

4.8 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A avaliação do acúmulo de neutrófilos no intestino foi realizada pelo ensaio de quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) como descrito em (Souza et al., 2003). Os fragmentos dos tecidos armazenados a -20°C foram descongelados, pesados e suspensos em salina EDTA, homogeneizados em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M de Na₃PO₄, 0,015 M de Na₂EDTA), utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125-Fischer Scientific Pennsylvania, USA) e centrifugados a 10000 rpm por 10 min a 4°C. O precipitado foi submetido à lise hipotônica por meio da adição de mesmo volume de solução NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%, após 30 segundos. As amostras foram centrifugadas novamente e o precipitado ressuspensionado em tampão Na₃PO₄ 0,05 M (pH=5,4) com brometo de "hexadecyltrimethylammonium (HTAB)" 0,5% p/v, seguido de homogeneização.

Alíquotas de 1 mL de suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil, São Paulo, SP Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 10000 rpm a 4°C e os sobrenadantes coletados. A atividade da mieloperoxidase no precipitado ressuspenso foi determinada pela medida das alterações em densidade óptica (OD), utilizando tetrametilbenzidina -TMB (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, multiskan RC, Uniscience do Brasil) a 450nm.

4.9 Determinação da atividade de peroxidase eosinofílica (EPO)

A determinação do influxo de eosinófilos foi realizada conforme descrito por Strath & Sanderson, 1985. Amostras de íleo foram processadas utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125-Fischer Scientific Pennsylvania, USA), seguindo a proporção de 1,9 ml de PBS para cada 100 mg de tecido para homogeneização, seguida de centrifugação em 10.000 rpm por 10 minutos, sendo coletado o sobrenadante para o ensaio de ELISA. Adicionou-se mesmo volume de solução NaCl 0,2% e NaCl 1,6% com glicose 5%, após 30 segundos, para a lise de hemácias. As amostras foram centrifugadas novamente, o sobrenadante descartado e o precipitado suspenso em 1,0 ml de 0,5% de brometo de amônio hexadeciltrimetil em PBS. Posteriormente, esse homogenato final foi congelado três vezes em nitrogênio líquido e centrifugado a 4 °C, 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático com a adição de um montante igual de substrato (1,5 mmol/L 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 lida na absorbância de 492 nm em espectrofotômetro.

4.10 Determinação da atividade de N-acetilglucosaminidase (NAG)

A análise do influxo de macrófagos foi realizada pelo ensaio de NAG. Após descongelamento dos fragmentos de íleo armazenados a -20° C, o tecido (100 mg

de tecido em 2mL de solução tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M de Na₃PO₄, 0,015 M de Na₂EDTA), utilizando homogeneizador elétrico (Power Gen 125- Fischer Scientific, Pennsylvania, USA). Em seguida, foi centrifugado por 10 min a 10000 rpm a 4°C e o precipitado foi submetido à lise hipotônica de hemácias (1 mL de solução de NaCl 0,2% p/v seguido da adição, 30 segundos após, de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% p/v e glicose 5% p/v). Após nova centrifugação sob as mesmas condições anteriores, o precipitado foi ressuscitado em solução de NaCl 0,9% p/v / Triton x 100 0,1% v/v e centrifugado novamente. Posteriormente, adicionou-se 100 µL das amostras diluídas em tampão citrato/fosfato a uma placa de 96 poços, em duplicata. Em seguida, foram adicionados 100µL da solução formada pelo substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosaminida com tampão citrato/fosfato e a placa incubada a 37°C por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de tampão glicina 0,2 M e realizada a leitura em espectrofotômetro a 405 nm.

4.11 Composição da microbiota

Amostras de fezes, íleo e conteúdo luminal foram maceradas e diluídas em NaCl 0,9% p/v, sendo que o íleo foi macerado com auxílio de um cadinho e as demais amostras no próprio eppendorf com auxílio de uma ponteira. Após a diluição seriada, as amostras foram cultivadas no meio sólido seletivo MacConkey e no meio MRS, para análise do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de Enterobactérias e bactérias ácido-láticas, respectivamente. Os períodos de incubação foram de 24 horas para MacConkey e 48 horas para MRS.

4.12 Análise da expressão de *Ido1*

Para avaliar a possibilidade da ativação de AHR pela via do hospedeiro no metabolismo de TRP, foi avaliado a expressão do gene *Ido1*, por RT-qPCR.

Extração de RNA e RT-qPCR

Amostras de íleo de animais submetidos ao tratamento com 5-FU após os tempos determinados foram processadas para a extração de RNA, utilizando o

reagente Trizol (Life Technologies) de acordo com o protocolo do fabricante. A síntese do cDNA foi realizada por meio da transcrição reversa, sendo utilizados 2,0 µg de RNA e 50 µM do primer Oligo dT (Promega Cor, Madison WI, EUA). Posteriormente, incubou-se por 5 minutos a 70°C, a fim de promover a separação das fitas de RNA e o anelamento do *primer*, e em seguida foram colocadas no gelo durante 5 minutos, para inibir a formação de produtos inespecíficos. Em seguida, foram adicionados 1,5 µL de dNTPs a 100 mM (Promega Cor, Madison, WI, EUA), 4 µL tampão M-MLV 5X (Promega Cor, Madison WI, EUA) e 200 U da enzima Transcriptase reversa-M-MLV (Promega Cor, Madison WI, EUA) e 8,5 µL de água Milli-Q autoclavada, sendo incubado por 2 horas a 42°C para ocorrer a transcrição reversa do mRNA. Para prosseguir a amplificação, foram utilizados 5 µL da amostra de cDNA.

Para a execução da PCR utilizou-se 10µL de PowerSYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied biosystems, Foster City, CA, EUA), 1,5µL de primer senso a 5µM, 1,5µL de primer anti-senso a 5µM e 2µL de água Milli-Q, conforme o protocolo para PCR com SYBR Green do termociclador StepOne PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Após a amplificação do cDNA utilizando *primers* específicos para cada gene de escolha, foi amplificado o cDNA do gene *RPL4* (proteína ribossomal L4) como controle constitutivo. As amostras foram, então, normalizadas em relação ao gene constitutivo, e foi realizado o cálculo segundo o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a obtenção dos resultados.

As sequências de iniciadores para amplificação utilizados na RT-qPCR são descritas a seguir:

Ido1:

Fw- 5'- TCA AAG CAA TCC CCA CTG TAT CC -3'

Rv- 5'- TCC ACA AAG TCA CGC ATC CTC -3'

4.13 Análise Estatística

Foi realizado teste de normalidade para verificar se as amostras apresentavam distribuição Gaussiana. As comparações estatísticas entre as médias de cada grupo em um determinado tempo foram feitas por ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman-Keuls. Essa análise inclui os parâmetros avaliados a

partir da eutanásia, como contagem de leucócitos, comprimento do intestino, UFCs de bactérias anaeróbias facultativas, MPO, EPO, NAG e qPCR, além do peso e escore quando são obtidos apenas em um tempo específico. Por outro lado, quando os animais de diferentes grupos foram acompanhados ao longo do tempo, como o peso corporal e escore clínico, utilizou-se a análise ANOVA “two way” seguida de pós-teste Bonferroni. A taxa de sobrevivida foi analisada pela comparação de curvas de sobrevivida. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Os resultados foram apresentados como média \pm 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).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU:

5.1.1 Estabelecimento do modelo de quimioterapia com 5-FU:

Inicialmente, realizou-se a padronização da dose de 5-FU a partir da avaliação da susceptibilidade à mucosite intestinal, que inclui a análise de índices de doença, como peso corporal e escore clínico (Figura 14B), e acompanhamento da taxa de sobrevivência (Figura 14C), durante 30 dias. Animais WT foram divididos em 4 grupos, nos quais receberam três doses diárias distintas de 5-FU ou veículo (PBS), sendo: 37,5 mg/kg ou 75 mg/kg ou 150 mg/kg.

A dose mais elevada provocou alterações significativamente mais graves, com perda de peso superior a 20% do peso inicial (Figura 14A) e graduação clínica elevada (Figura 14B), ambos no 5º dia do protocolo experimental. Assim, a quimioterapia com a dose de 150 mg/kg resultou na mortalidade adiantada de todos os animais, sendo que 100% dos animais sucumbiram à quimioterapia antes do 10º dia do protocolo experimental (Figura 14C). Por outro lado, a menor dose produziu efeitos mais transitórios, com perda de peso de cerca de 10% do peso inicial (Figura 14A) e escore clínico significativamente elevado (Figura 14B) apenas no 5º dia do protocolo experimental. Não foram observadas alterações na graduação clínica após 10 dias do início do tratamento com a dose de 37,5 mg/kg, o que culminou com uma taxa de sobrevivência de cerca de 75% nesse grupo de animais (Figura 14C). Em contrapartida, a dose de 75 mg/kg levou a uma perda de peso corporal (Figura 14A) e alterações clínicas (Figura 14B) mais duradouras, entre os dias 5 e 10 do protocolo experimental, levando à morte de 50% dos animais submetidos a quimioterapia (Figura 14C). Assim, a dose de escolha foi 75 mg/kg, uma vez que promoveu alterações moderadas, com uma taxa de sobrevivência de 50% dos animais, o que permite observar uma variação considerável no índice de doença, bem como o retorno aos níveis basais durante esse período de tempo (Figura 14).

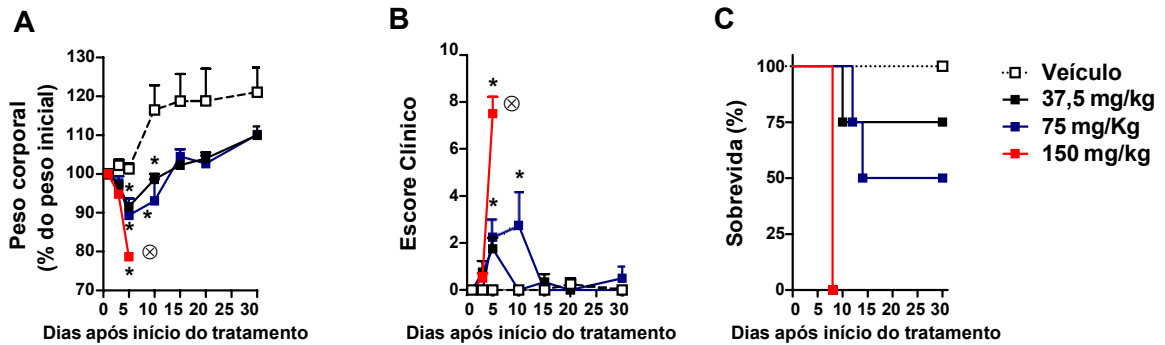


Figura 14- Avaliação temporal da susceptibilidade à mucosite intestinal induzida por diferentes doses de 5-FU (dose-resposta). Animais WT foram tratados (i.p.) com as respectivas doses de 5-FU: 37,5 mg/kg/d ou 75 mg/kg/d ou 150 mg/kg/d ou veículo (PBS) por três dias e acompanhados durante 30 dias quanto aos índices de doença, como peso corporal (A) e escore clínico (B) nos tempos determinados, conforme os gráficos, e taxa de letalidade (C). n = (4-6). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * $P < 0,01$.

5.1.2 Caracterização temporal da mucosite intestinal induzida por 5-FU:

Após definir a dose de 5-FU (75 mg/kg/d), foi realizada a caracterização da mucosite ao longo do tempo. Animais WT foram eutanasiados nos tempos estabelecidos (dias 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20 e 30 após o início do tratamento), para a avaliação do índice de doença (peso corporal e escore clínico) (Figura 15), parâmetros inflamatórios (redução do comprimento do intestino, MPO, EPO, NAG) (Figura 16) e microbiológicos (conteúdo de enterobactérias e bactérias ácido-láticas) (Figura 17). A ação farmacológica do 5-FU foi evidenciada pela leucopenia, a partir da contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer (Figura 15A).

A leucopenia foi observada a partir do 5º dia após o início do tratamento e se manteve até o 10º dia do protocolo experimental. Após o 15º dia, as contagens de leucócitos circulantes foram reestabelecidos para valores normais (Figura 15A). A análise do índice de doença evidenciou uma perda de peso corporal no 5º dia após o início do tratamento (Figura 15B) e um aumento do escore clínico (Figura 15C) significativos no 5º e 8º dia do protocolo experimental.

Também houve alteração de alguns dos parâmetros inflamatórios analisados, como a redução do comprimento do intestino delgado (Figura 16A) nos dias 3 e 5 da doença, sendo restaurado após o dia 8, além do aumento do influxo de neutrófilos apenas no dia 5 do protocolo experimental (Figura 16B). Contudo, as atividades das

enzimas EPO (Figura 16C) e NAG (Figura 16D) no tecido intestinal não foram alteradas em nenhum dos tempos experimentais avaliados.

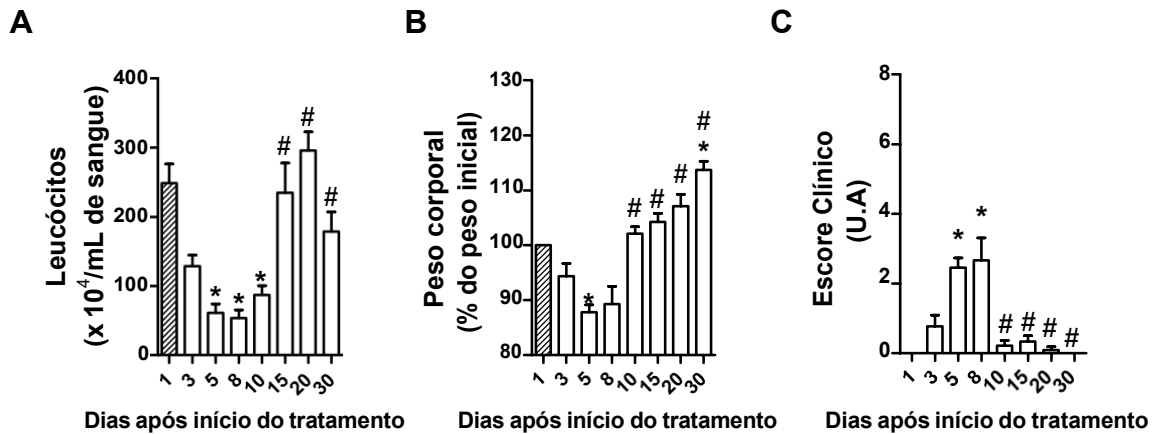


Figura 15- Avaliação do efeito do quimioterápico sobre parâmetros clínicos ao longo do tempo. O efeito do 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) foi verificado por meio da contagem de leucócitos no sangue em câmara de Neubauer, após a eutanásia nos tempos indicados (A). Nesses determinados dias foram avaliados o peso corporal (B) e escore clínico da doença (C) dos animais WT submetidos à mucosite intestinal por 5-FU. Cinética obtida de 6 experimentos; n= (3-6) por grupo. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * $P < 0,05$ vs dia 1 ou # $P < 0,05$ vs dia 5. U.A: unidades arbitrárias.

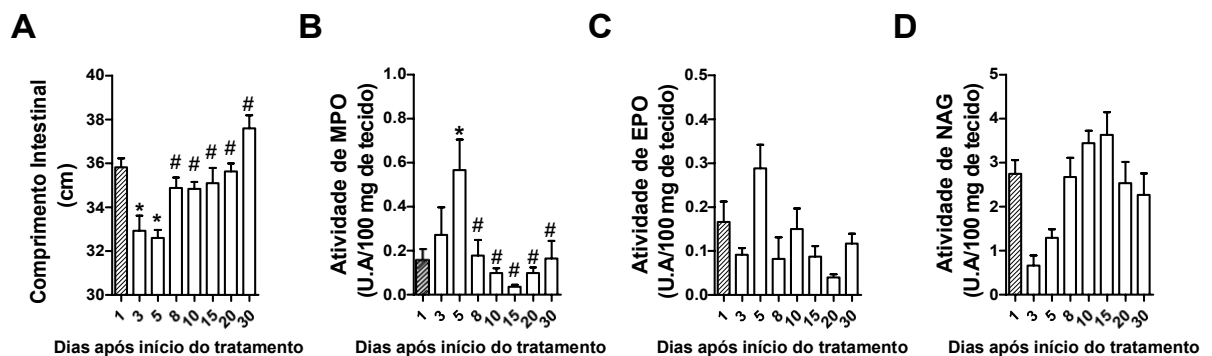


Figura 16- Avaliação temporal do comprimento intestinal e do influxo de leucócitos para o íleo de animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU. Após a indução da mucosite por 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) durante 3 dias, os animais WT foram eutanasiados nos momentos indicados para a coleta de intestino delgado, para determinação do seu comprimento (A). A partir de fragmentos de íleo, foram realizadas as análises posteriores das atividades das enzimas MPO (B), EPO (C) e NAG (D). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Cinética obtida de 6 experimentos; n= (3-6) por grupo. * $P < 0,05$ vs dia 1 ou # $P < 0,05$ vs dia 5. U.A: unidades arbitrárias.

Posteriormente, avaliou-se se a quimioterapia foi capaz de induzir alterações histopatológicas no íleo, após 5 e 8 dias do início do tratamento com 5-FU. O escore histológico não apresentou diferença significativa nos tempos indicados (Figura

17A). Observou-se apenas um discreto encurtamento das vilosidades do íleo, com presença ou não de um infiltrado inflamatório ou edema leve e ausência de erosão, hemorragia e hiperemia (Figura 17B).

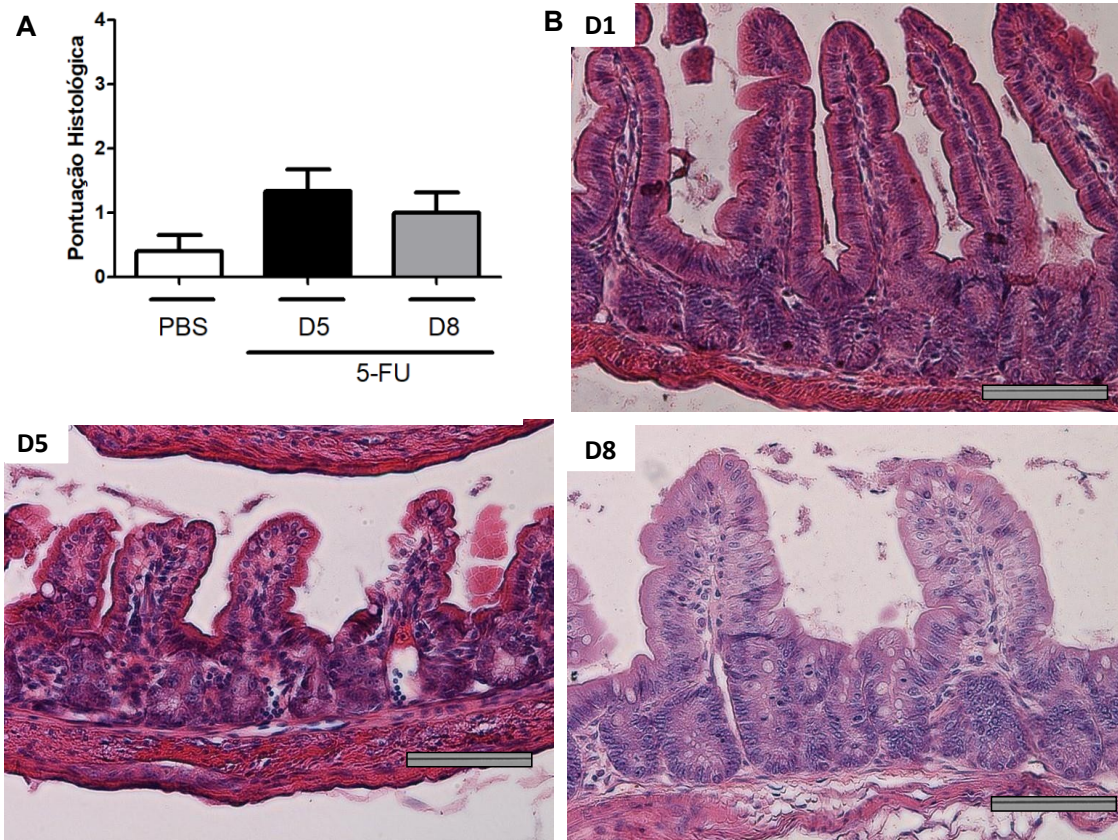


Figura 17- Análise histológica do íleo de animais submetidos à quimioterapia. Animais tratados com 5-FU (75 mg/kg/d; por 3 dias) ou não (D1) foram eutanasiados após 5 e 8 dias do início do tratamento e o íleo coletado para análise histológica após coloração por H&E (B) e avaliação do escore histopatológico (A) nos tempos indicados. Nos dias 5 e 8 do protocolo experimental foram observados um discreto encurtamento das vilosidades do íleo em relação ao D1 (B). A barra, na prancha histológica, representa 100 μ m. Em A, as barras representam a média \pm erro padrão.

O próximo passo foi analisar a presença de alterações na composição da microbiota, por meio da quantificação de UFCs de enterobactérias e bactérias ácido-láticas em ágar MacConkey e ágar MRS, respectivamente. Para isso, foram analisadas amostras de fezes, conteúdo luminal do íleo e um fragmento de íleo (Figura 18). Os animais foram eutanasiados nos tempos estabelecidos para a coleta de íleo e remoção do conteúdo luminal. Não houve alterações estatisticamente relevantes do conteúdo total de enterobactérias nas fezes e no conteúdo luminal dos camundongos submetidos a quimioterapia em nenhum dos tempos experimentais avaliados (Figura 18A e 18B). No entanto, houve uma expansão do número de

UFCs de enterobactérias no tecido do íleo (Figura 18C) no 8º dia do protocolo experimental, sendo que a partir do 15º dia de experimento, o número de UFCs de enterobactérias já havia retornado aos níveis do dia 1. Em relação às bactérias ácido-láticas, detectou-se apenas uma elevação do seu conteúdo nas fezes entre os dias 3 e 10 do protocolo experimental (Figura 18D), retornando aos níveis do 1 no 30º dia do experimento. Não houve alterações marcantes do conteúdo de bactérias ácido-láticas nos outros sítios avaliados (Figuras 18E e 18F).

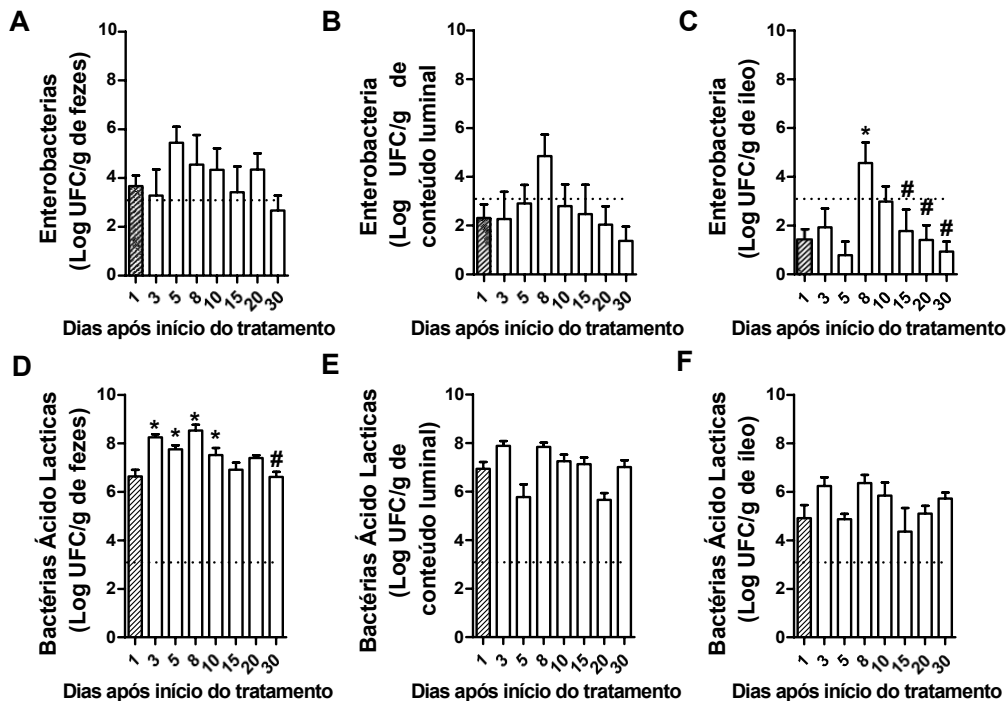


Figura 18- Avaliação temporal da quantificação de UFCs de enterobactérias e bactérias ácido lácticas nas fezes, conteúdo luminal e íleo de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Após a indução da mucosite por 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) durante 3 dias, foram coletadas as fezes dos animais WT nos tempos determinados e analisadas pela quantificação de UFCs em ágar MacConkey e ágar MRS para avaliação do conteúdo de enterobactérias (A) e bactérias ácido-láticas (D), respectivamente. Após serem eutanasiados, o conteúdo luminal dos animais foi coletado a partir do íleo. O conteúdo luminal (B,E) e tecido do íleo (C,F) foram analisados pela quantificação de UFCs de enterobactérias (B,C) em ágar MacConkey e bactérias ácido-láticas (E,F) em ágar MRS. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Cinética obtida de 5 ou 6 experimentos; n= (3-6) por grupo. * $P < 0,05$ ou # $P < 0,05$ vs dia 8. U.A: unidades arbitrárias.

5.2 Avaliação do papel de AHR na mucosite intestinal induzida por quimioterapia:

Após a caracterização temporal da mucosite, buscou-se investigar um possível mecanismo envolvido no desenvolvimento da doença. Diversos estudos demonstram o papel do AHR na manutenção da homeostase imune do intestino e consequente proteção contra doenças, como IBDs (Zelante et al., 2013; Islam et al., 2017). No entanto, não há ainda na literatura a correlação entre esse receptor e mucosite intestinal induzida por quimioterapia. A fim de estabelecer o papel de AHR no desenvolvimento da doença, foram utilizados animais deficientes para AHR ($AHR^{-/-}$) ou o tratamento com um antagonista desse receptor (α -NF) (Figura 19).

Tanto a deleção genética quanto a inibição farmacológica do AHR levaram à uma maior susceptibilidade dos animais à quimioterapia, tanto em relação ao índice de doença quanto à taxa de sobrevivida (Figura 19). Os animais $AHR^{-/-}$ apresentaram redução do peso corporal (Figura 19A) e aumento do escore clínico (Figura 19B) significativos no dia 10 após início do tratamento, quando a taxa de sobrevivida correspondia a 25% (Figura 19C). Nos animais tratados com α -NF, porém, essas alterações ocorreram a partir do dia 5. Esse grupo foi eutanasiado no dia 8, o que coincidiu com o pico da doença (Figura 19B) e correspondeu a uma taxa de sobrevivida de 12,5% (Figura 19C). Observou-se ainda que em ambos os grupos, $AHR^{-/-}$ ou tratados com α -NF, o peso corporal (Figura 19A) e escore clínico (Figura 19B) não retornaram aos níveis basais, conforme observado nos animais selvagens tratados apenas com 5-FU e veículo.

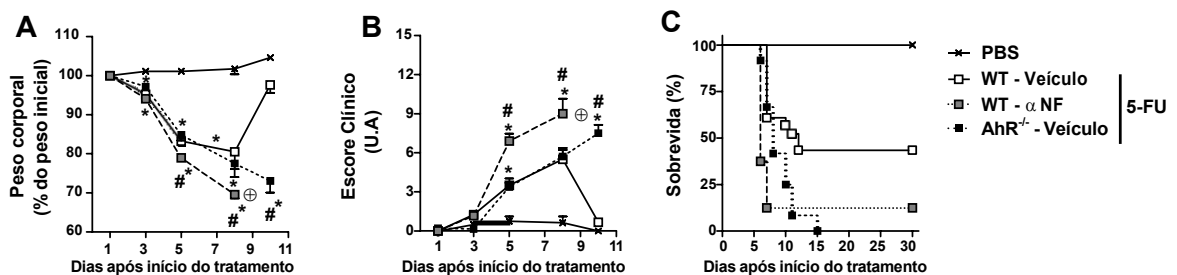


Figura 19- Avaliação da susceptibilidade à mucosite intestinal induzida por 5-FU em animais $AHR^{-/-}$ ou WT tratados com α -NF. Animais WT ou $AHR^{-/-}$ foram tratados com 3 doses de 5-FU (75 mg/kg/d; i.p); o grupo WT- α -NF também recebeu α -NF (10 mg/kg/d; i.p) durante todo o período de experimento; o grupo PBS corresponde a animais WT sem quimioterapia. Os animais foram avaliados em relação à perda percentual de peso corporal (A) e escore clínico da doença (B) nos tempos definidos e a taxa de sobrevivida (C) foi acompanhada por 30 dias. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Cinética obtida de 5 experimentos. n= 12 a 28 / grupo * $P < 0,05$ vs PBS ou # $P < 0,05$ vs WT-veículo tratado com 5-FU.

Em seguida, a efetividade do 5-FU como agente quimioterápico foi comprovada pela leucopenia marcante nos dias 5 e 8 após a indução da mucosite com 5-FU (Figura 20A), em que a eutanásia foi realizada. Os parâmetros inflamatórios avaliados foram o comprimento do intestino delgado (Figura 20B) e atividade da enzima MPO (Figura 20C). Os grupos tratados com α -NF ou veículo mostraram uma diminuição do comprimento intestinal no dia 5. Essa redução do comprimento tornou-se mais pronunciada no dia 8 para o grupo que recebeu α -NF, enquanto o grupo veículo retornou aos níveis basais. No entanto, os animais $AHR^{-/-}$ não apresentaram variação no comprimento do intestino (Figura 20B). O infiltrado de neutrófilos aumentou significativamente no dia 5 em todos os grupos, porém, não houve diferença entre os animais $AHR^{-/-}$ ou tratados com α -NF e o veículo. No dia 8, o infiltrado neutrofílico para o intestino é restaurado aos níveis dos grupos controle em todos os grupos avaliados (Figura 20C).

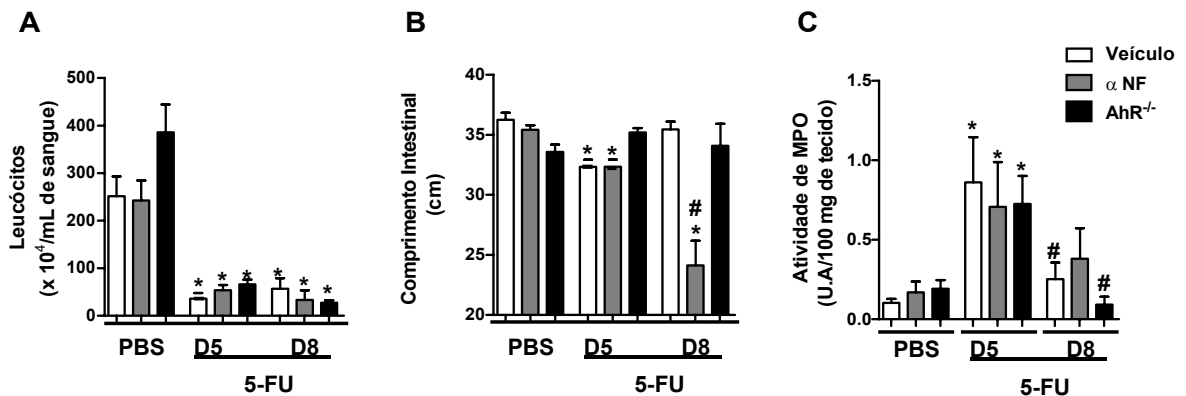


Figura 20- Avaliação da susceptibilidade à mucosite intestinal induzida por 5-FU em animais $AHR^{-/-}$ ou WT tratados com α -NF. Animais WT ou $AHR^{-/-}$ foram tratados com 3 doses de 5-FU (75 mg/kg/d; i.p). Um grupo de animais WT recebeu 3 doses de 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) e foi tratado com α -NF (10 mg/kg/d; i.p) durante todo o período do experimento. Os grupos PBS (WT ou $AHR^{-/-}$) recebem o mesmo volume de veículo ou α -NF (10 mg/kg; i.p). Os animais foram eutanasiados nos dias 5 e 8 após indução da mucosite com 5-FU, em que foram coletados sangue para a contagem de leucócitos totais (A) e intestino delgado para a determinação do comprimento intestinal (cm) (B) e quantificação da atividade de MPO (C). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Os dados foram obtidos em 5 experimentos. n= 3-13 por grupo. * $P < 0,05$ vs PBS ou # $P < 0,05$ vs 5-FU – D5.

Posteriormente, avaliou-se o conteúdo de enterobactérias e bactérias ácido-láticas no conteúdo luminal e no tecido do íleo (Figura 21), a fim de se comparar a microbiota dos animais submetidos à indução da mucosite com 5-FU. No conteúdo luminal, a única alteração marcante foi a expansão de enterobactérias no íleo de

animais AHR^{-/-} tratados com 5-FU nos dias 5 e 8 do protocolo experimental (Figura 21A). Não houve alterações no conteúdo de bactérias ácido-láticas no conteúdo luminal do íleo em nenhum dos grupos estudados ao longo de todo o período experimental (Figura 21B). No tecido do íleo, foi observada uma expansão de enterobactérias nos animais AHR^{-/-} tratados com 5-FU no 8º dia do experimento (Figura 21C) e de bactérias ácido-láticas nos animais AHR^{-/-} tratados com 5-FU no 5º dia e nos animais selvagens tratados com 5-FU e αNF no 8º dia do protocolo experimental (Figura 21D).

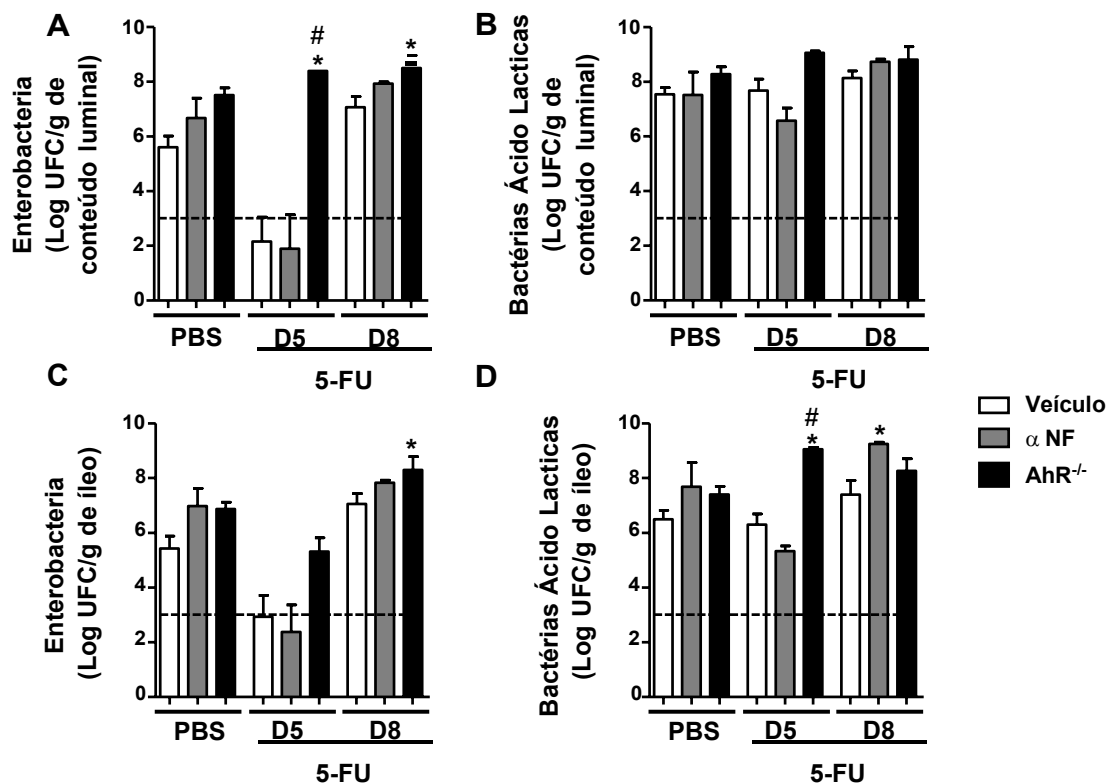


Figura 21- Avaliação do conteúdo de bactérias anaeróbias facultativas na microbiota de animais com mucosite intestinal. Animais WT ou AHR^{-/-} receberam 5-FU (75 mg/kg/d; i.p; 3 dias) ou PBS; no grupo WT tratado com α-NF (10 mg/kg; i.p), durante todo o período do experimento, foram administrados 5-FU (75 mg/kg; i.p; 3 dias) ou PBS. A eutanásia foi realizada nos dias 5 (D5) e 8 (D8) após indução da doença, em que foi coletado o íleo para a quantificação de UFCs de enterobactérias (A) e bactérias ácido-láticas (B) em meio ágar MacConkey e ágar MRS, respectivamente. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. Dados obtidos de 3 experimentos. n= 5-12 por grupo. A linha tracejada indica o limite de detecção. * P<0,05 vs WT PBS e # P<0,05 vs WT 5-FU+veículo no D5.

5.3 Determinação do papel de IDO1 na mucosite intestinal induzida por quimioterapia:

Após sugerir que AHR exerce um papel protetor no curso da mucosite induzida por quimioterapia, o próximo objetivo foi verificar se o metabolismo de TRP do hospedeiro, por meio da enzima IDO1, que converte o TRP em ligantes de AHR, está envolvido na ativação de AHR após a quimioterapia. Para determinar se IDO1 exerce um papel na patogênese da mucosite, foram utilizados animais WT ou deficientes para essa enzima ($IDO1^{-/-}$) (Figura 22) tratados com 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) durante 3 dias.

Foi realizada a análise da expressão de *Ido1* por qRT-PCR no íleo de animais WT tratados ou não (D1) com 5-FU (Figura 22). No entanto, não houve diferença estatística nos tempos avaliados. As análises do índice de doença (Figuras 23A e 23B) e taxa de sobrevivência (Figura 23C) indicaram que os animais $IDO1^{-/-}$ apresentaram menor escore clínico da doença em relação aos animais WT no D5 após início da administração de 5-FU (Figura 23B), embora não tenha-se observado qualquer diferença em relação ao peso corporal (Figura 23A). Por fim, a taxa de letalidade dos animais $IDO1^{-/-}$ tratados com 5-FU foi significativamente menor quando comparada aos animais WT que receberam quimioterapia (Figura 23C). Em conjunto, esses dados sugerem que a ausência de IDO1 não resulta no agravamento da mucosite, pelo contrário, revelam uma atenuação de parâmetros clínicos e diminuição da letalidade.

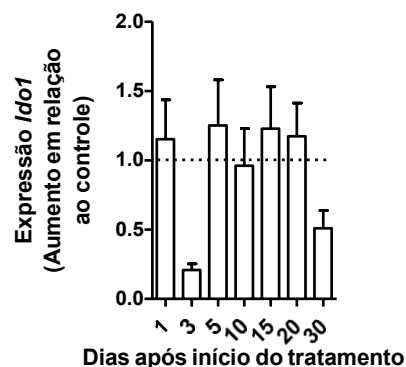


Figura 22- Análise da expressão da enzima *Ido1* no íleo de animais WT submetidos à quimioterapia. Após a indução da mucosite intestinal com 3 doses de 5-FU (75 mg/kg/d; i.p), os animais foram eutanasiados para a coleta de íleo e posterior análise da expressão de *Ido1* por qRT-PCR nos tempos determinados. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. n=3-7 por grupo.

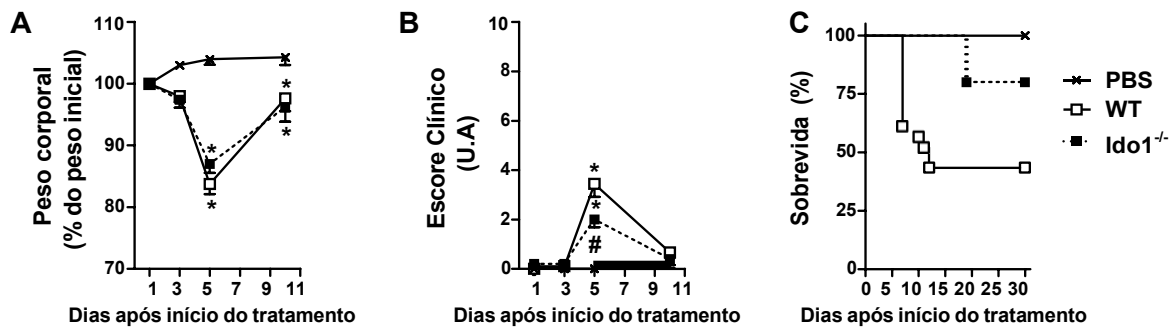


Figura 23- Avaliação da susceptibilidade de animais IDO1^{-/-} à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Após a indução da mucosite com 3 doses de 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) em animais WT ou IDO1^{-/-}, os animais foram acompanhados durante 10 dias para a análise do peso corporal (A), do escore clínico da doença (B) nos tempos estabelecidos, ou por 30 dias, para avaliação da taxa de sobrevivência (C). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. n=5-10 por grupo. **P*<0,01 vs PBS ou #*P*<0,01 vs WT.

5.4 Avaliação do efeito do tratamento com antimicrobianos no curso da mucosite intestinal induzida por quimioterapia:

Conforme mostrado anteriormente (Figura 18), experimentos indicaram uma alteração da composição da microbiota por volta do 8º dia do protocolo experimental, com expansão de enterobactérias e de bactérias ácido-láticas no lúmen do íleo e nas fezes, respectivamente. Ambos os grupos bacterianos incluem espécies produtoras de metabólitos de TRP potencialmente envolvidos na ativação de AHR. Assim, para avaliar o efeito da redução desses táxons no desenvolvimento da doença, os animais WT receberam ciprofloxacino (0,2 g/L) ou vancomicina (0,5 g/L) ou ampicilina (1 g/L) na água de beber até o momento da eutanásia. Foram avaliados os índices de doença (Figura 24), a leucopenia, o comprimento do intestino e conteúdo de bactérias anaeróbias facultativas no conteúdo luminal do íleo (Figura 25), além do infiltrado de leucócitos no íleo (Figura 26).

A análise do índice de doença (Figura 24) revelou uma diferença mais pronunciada entre o grupo tratado com ampicilina (1 g/L) e o veículo (Figuras 24E e 24F) quando comparado com os demais antimicrobianos. No dia 10 após indução da mucosite, apenas os animais que receberam ampicilina apresentaram marcante redução do peso corporal em relação ao veículo. A ampicilina também foi o único antimicrobiano que promoveu um aumento significativo da graduação clínica da doença a partir do dia 5, com o pico no dia 10. No grupo que recebeu

vancomicina, embora não tenha havido diferenças quanto à perda de peso corporal em relação ao grupo tratado com veículo (Figura 24C), o escore clínico também está aumentado no dia 10 (Figura 24D). Porém essa variação é menos expressiva do que aquela observada para o grupo com ampicilina. O ciprofloxacino, no entanto, não levou a alterações no peso corporal ou no índice de doença quando comparado ao veículo (Figuras 24A e 24B).

Para a análise dos demais parâmetros a partir das amostras de sangue e intestino, os animais foram eutanasiados no 10º dia do protocolo experimental. Todos os grupos submetidos à quimioterapia apresentaram leucopenia, com contagem de leucócitos semelhantes entre os grupos tratados com 5-FU (Figura 25A). Porém, não houveram maiores alterações do comprimento intestinal entre os grupos, exceto por um discreto aumento no grupo que recebeu PBS e ampicilina em relação ao grupo controle (Figura 25B). Os grupos tratados com Vancomicina, tratados ou não com quimioterápico, apresentaram expansão de enterobactérias em relação aos grupos controle (Figura 25C). Além disso, o grupo tratado com ampicilina e submetido a quimioterapia apresentou um maior conteúdo de enterobactérias no lúmen do que animais submetidos a quimioterapia e tratados com veículo. Quanto ao conteúdo de bactérias ácido-láticas no lúmen, a ampicilina foi o único antibiótico que levou a uma diminuição significativa nesse grupo após a quimioterapia (Figura 25D). Os outros grupos não apresentaram variação significativa do conteúdo de bactérias ácido-láticas em relação aos grupos controle no tempo avaliado.

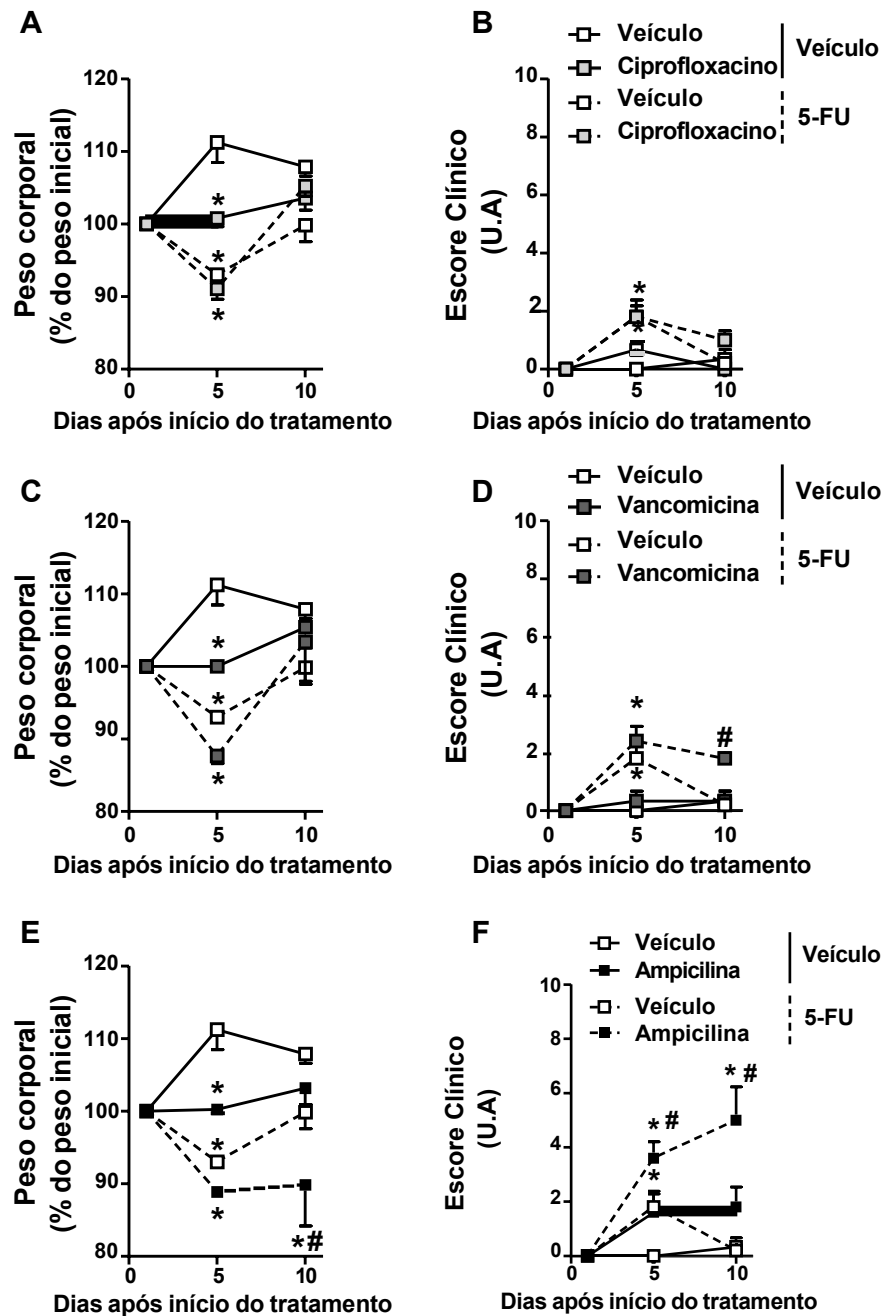


Figura 24- Análise do efeito do tratamento com antimicrobianos no índice de doença em animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais WT foram tratados com 3 doses de 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) ou 3 doses de 5-FU (75 mg/kg; i.p) e antimicrobianos: ciprofloxacino (0,2 g/L) (A,B) ou vancomicina (0,5 g/L) (C,D) ou ampicilina (1 g/L) (E,F) na água de beber durante o período analisado. O grupo veículo recebeu água ou antimicrobiano: ciprofloxacino (0,2 g/L) ou vancomicina (0,5 g/L) ou ampicilina (1 g/L) sob as mesmas condições já citadas. Foram avaliados a perda de peso corporal (%) (A, C, E) e escore clínico (B, D, F). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. $n=3-5$ por grupo. * $P<0,05$ vs Veículo+veículo ou # $P<0,05$ vs veículo+5-FU.

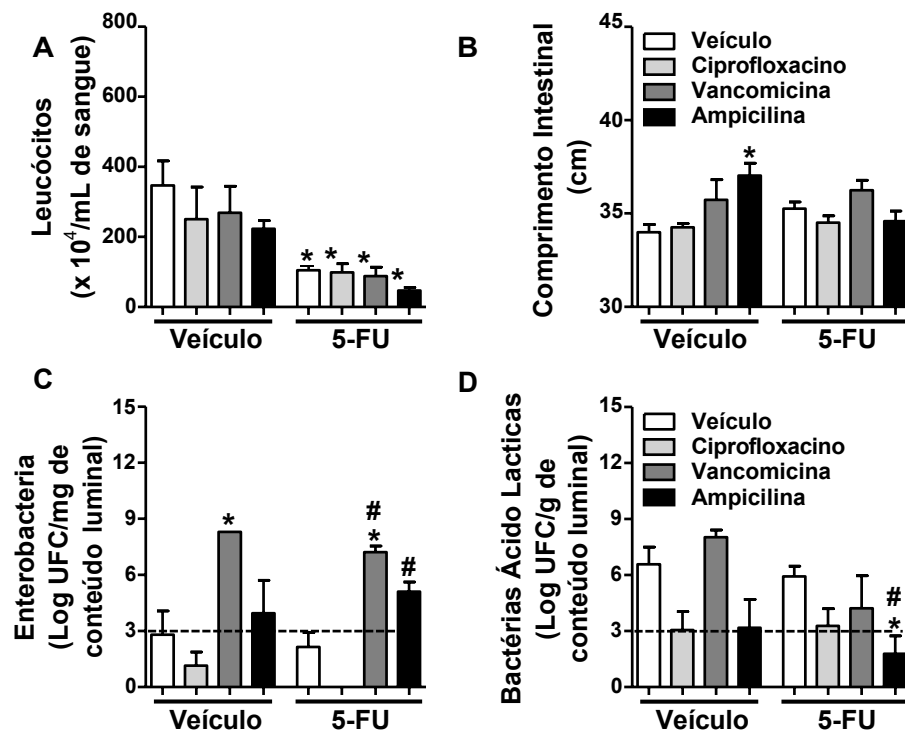


Figura 25- Avaliação da leucopenia, comprimento do intestino e conteúdo de bactérias anaeróbias facultativas no lúmen do íleo de animais com mucosite. Animais WT foram tratados com 3 doses de 5-FU (75 mg/kg/d; i.p) e água ou antimicrobiano: ciprofloxacino (0,2 g/L) ou vancomicina (0,5 g/L) ou ampicilina (1 g/L) na água de beber durante todo o período experimental. O grupo veículo recebeu água ou antimicrobiano sob as mesmas condições já citadas. Os animais foram eutanasiados no dia 10 do protocolo experimental, em que foram coletados sangue para a contagem de leucócitos totais (A) e intestino delgado para a determinação do comprimento intestinal (B). A partir de um fragmento de íleo, foi retirado o conteúdo luminal para a quantificação de UFCs de enterobactérias (C) e bactérias ácido-láticas (D) em meio ágar MacConkey e ágar MRS, respectivamente. Dados obtidos de 2 experimentos n=6-10 por grupo. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. * $P < 0,05$ vs Veículo+veículo ou # $P < 0,05$ vs 5-FU+veículo.

Uma vez que apenas os animais tratados com ampicilina apresentaram uma doença acentuada após a quimioterapia, como último passo, foi avaliado nesse grupo o influxo de leucócitos para o íleo (Figura 26), determinados pelas atividades das enzimas MPO, EPO e NAG. Observou-se um aumento do infiltrado de neutrófilos apenas no grupo que recebeu veículo e 5-FU no dia 5, sendo revertido no dia 10 (Figura 26A). O grupo que recebeu quimioterapia e ampicilina apresentou redução do influxo de neutrófilos no dia 5, quando comparado com o grupo que recebeu 5-FU e veículo. Por outro lado, não houve alteração significativa do influxo de eosinófilos e macrófagos, evidenciados pelas atividades de EPO e NAG, respectivamente (Figura 26B e 26C).

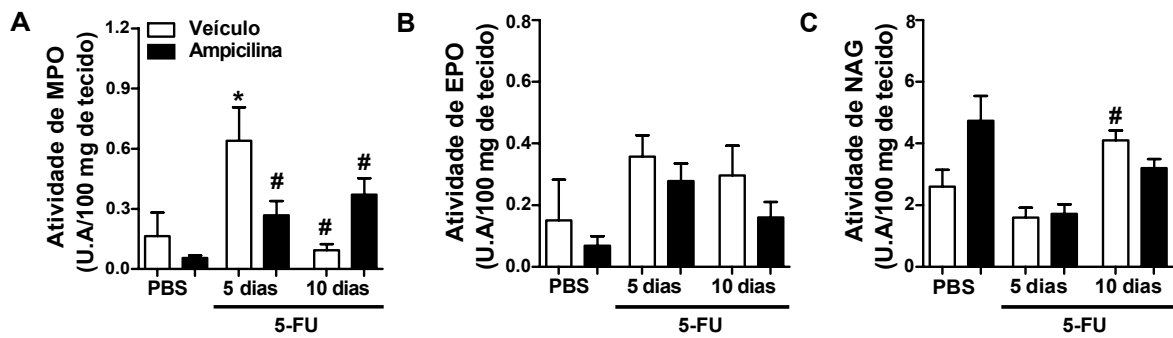


Figura 26- Avaliação do influxo de leucócitos para o íleo de animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com ampilicina. Os animais WT submetidos ao protocolo de indução da mucosite por 5-FU (75 mg/kg/d; 3 dias) foram tratados com ampilicina (1g/L) ou água durante todo o período experimental. O grupo PBS recebeu ampilicina (1g/L) ou água durante o mesmo tempo. Os animais foram eutasiados 5 ou 10 dias após o início do tratamento para a coleta de fragmentos de íleo, a fim de avaliar o influxo de neutrófilos (A), eosinófilos (B) e macrófagos (C). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. n= 3-9 por grupo. * $P < 0,05$ vs PBS+veículo ou # $P < 0,05$ vs 5-FU+veículo.

5.5 Avaliação do efeito da administração de lald para animais submetidos à quimioterapia e tratados com ampilicina:

Após comprovar que o tratamento com ampilicina (1 g/L) induz uma doença mais grave, de maneira análoga à de animais deficientes na ativação de AHR, nosso próximo passo foi analisar se a administração de lald, um metabólito de TRP produzido pela microbiota e capaz de ativar AHR, reverte esses efeitos provocados pela ampilicina. Assim, os animais receberam 5-FU ou PBS, e veículo (água) ou ampilicina e foram tratados ou não com lald para a avaliação do índice de doença (Figura 27) e conteúdo de bactérias anaeróbias facultativas (Figura 28).

Todos os grupos analisados apresentaram redução do peso corporal (Figura 27A) e aumento do escore clínico da doença (Figura 27B) no 5º dia após indução da mucosite intestinal com 5-FU. No grupo que recebeu quimioterapia e foi tratado com ampilicina e veículo, essas alterações se mantiveram no 8º dia e, em ambos os tempos, o escore clínico foi significativamente mais elevado em relação aos demais grupos, que mostraram uma melhora desses parâmetros clínicos no dia 8 do protocolo experimental.

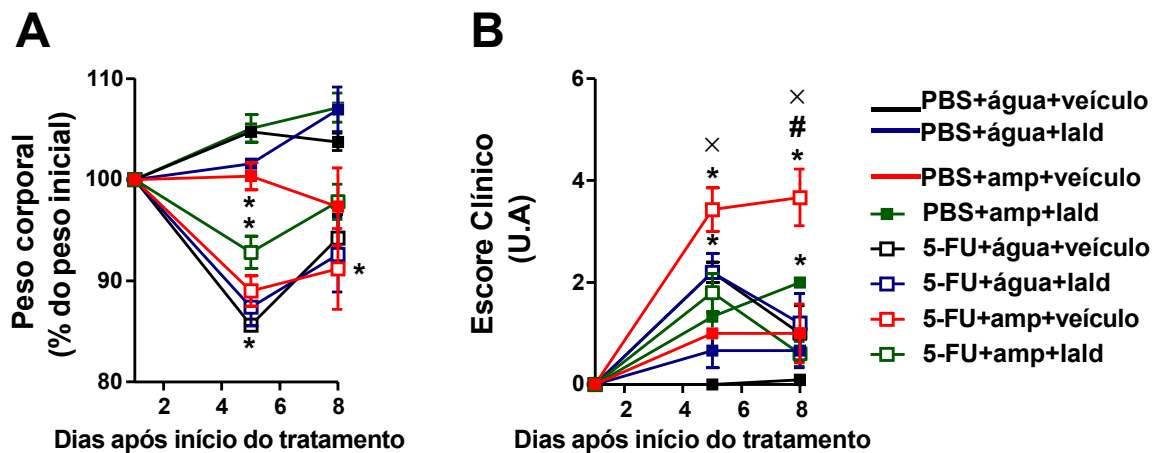


Figura 27- A administração de lald restaura as alterações clínicas provocadas pela ampicilina em animais submetidos a mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais submetidos ao protocolo de indução da mucosite por 5-FU (75 mg/kg/d; 3 dias) ou não (PBS) foram tratados com veículo (água) ou ampicilina (1 g/L; na água de beber) e receberam lald (100 mg/kg/d; gavagem) ou veículo durante todo o período experimental. Foram analisados o peso corporal (A) e o escore clínico (B) nos tempos estabelecidos. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Dados obtidos de 1 experimento. $n=3-8$ por grupo. * $P<0,05$ vs PBS+água+veículo ou # $P<0,05$ vs 5-FU+água+veículo ou x $P<0,05$ vs 5-FU+amp+lald.

Posteriormente, buscou-se analisar se a administração de lald, por via intragástrica, altera o conteúdo de enterobactérias e bactérias ácido-láticas no lúmen do íleo (Figura 28). Observou-se que, dentre os grupos submetidos ao protocolo de indução de mucosite intestinal, há uma expansão de enterobactérias independentemente do uso de ampicilina ou lald, sendo que no grupo que recebeu água e lald, esse aumento em relação ao grupo que recebeu água e veículo não foi observado. Os grupos que receberam ampicilina mostraram maior conteúdo de enterobactérias independentemente da quimioterapia (Figura 28A). Quanto às bactérias ácido-láticas, não foi observada alteração do conteúdo dessas bactérias nos grupos analisados. (Figura 28B).

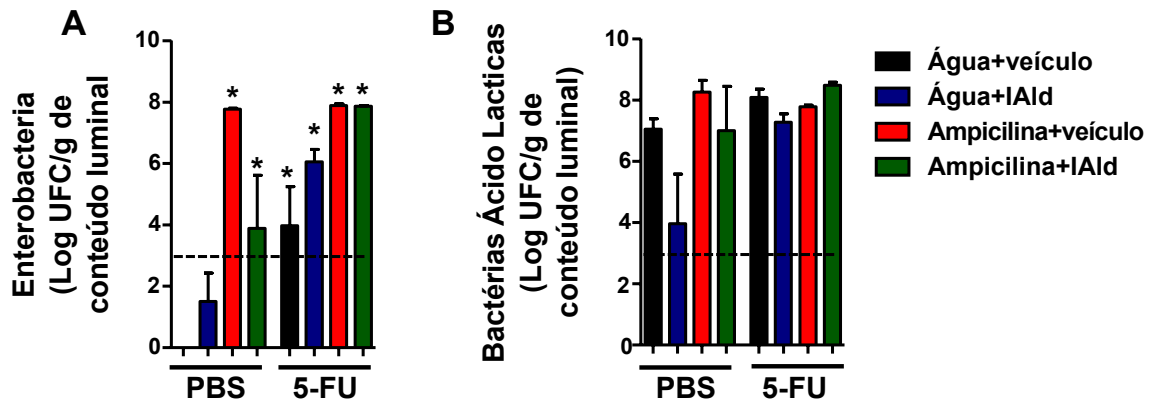


Figura 28- Avaliação do efeito da administração de lald na composição da microbiota do lúmen do íleo de animais submetidos à mucosite intestinal por 5-FU e tratados com ampicilina. Animais submetidos ao protocolo de indução da mucosite por 5-FU (75 mg/kg/d; 3 dias) ou não (PBS) foram tratados com veículo (água) ou ampicilina (1 g/L; na água de beber) e receberam lald (100 mg/kg/d; gavagem) ou veículo durante todo o período experimental. Os animais foram eutanasiados no 8º dia após início dos tratamentos para a coleta do conteúdo luminal do íleo, que foi quantificado em relação às UFCs de enterobactérias (A) e bactérias ácido-láticas (B) em meio ágar MacConkey e ágar MRS, respectivamente. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Dados obtidos de 1 experimento. n=3-8 por grupo. * $P < 0,05$ vs PBS+água+veículo ou # $P < 0,05$ vs 5-FU+água+veículo.

6 DISCUSSÃO

No nosso modelo de mucosite intestinal induzido por quimioterápico, AHR foi importante para controlar a resposta aos efeitos causados pela quimioterapia. Dentre os ligantes de AHR, o alvo desse estudo foram os metabólitos de TRP. Foi demonstrado que o metabolismo de TRP pela via do hospedeiro não contribui para a ativação de AHR, a partir da análise da expressão de *Ido1* e da susceptibilidade de animais *IDO1*^{-/-} à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Por outro lado, o tratamento com ampicilina reduziu o conteúdo de bactérias ácido-láticas e agravou a doença desencadeada pela quimioterapia. Essas alterações foram revertidas após a administração de lald, que é um agonista de AHR sintetizado por algumas bactérias ácido-láticas a partir do TRP.

Para a caracterização do modelo de mucosite intestinal, inicialmente realizou-se a padronização da dose de 5-FU, baseada na avaliação de parâmetros clínicos de doença e taxa de sobrevivência. A dose de escolha foi 75 mg/kg/d, uma vez que as alterações da graduação clínica da doença foram mais prolongadas em relação à menor dose, sendo observadas até o 10º dia após início do tratamento. A taxa de sobrevivência do grupo tratado com a dose de 75 mg/kg/d também foi moderada, o que possibilitou a avaliação temporal do curso da mucosite, diferentemente da dose mais elevada, que resultou na mortalidade de todos os animais antes do dia 10 do protocolo experimental. Assim, a dose escolhida permitiu a identificação do pico da doença nos dias 5 e 10, e o retorno aos níveis basais da graduação clínica após o dia 10 do protocolo experimental. Posteriormente, a caracterização temporal da mucosite intestinal induzida por 5-FU, utilizando a dose de 75 mg/kg/d, incluiu também a análise da inflamação e disbiose, além do índice de doença. As alterações desses parâmetros foram transitórias, cujos picos variaram entre os dias 5 e 8 e retornaram aos níveis normais cerca de 10 dias após o início da quimioterapia. No entanto, as alterações histológicas observadas nos tempos analisados foram discretas, caracterizadas por um encurtamento das vilosidades do íleo, infiltrado inflamatório e edema geralmente classificados como sendo de grau leve. Isso sugere que as alterações induzidas pela quimioterapia no presente modelo podem não ser decorrentes de uma lesão expressiva do tecido do íleo, como observado em diversos estudos, nos quais a mucosite intestinal está associada a

uma lesão tecidual e inflamação consideráveis (Pedroso et al., 2015). Em pacientes, o desenvolvimento da mucosite causada por 5-FU ocorre após dois dias do início da quimioterapia para mucosite intestinal e em torno de uma semana, no caso da mucosite oral. O pico da mucosite oral é atingido após aproximadamente duas semanas (Sonis, 2004). Geralmente, esse também é o tempo que leva para o início da fase de ulceração (Lalla et al., 2008). A cura dessas lesões na mucosa oral normalmente ocorre entre duas a quatro semanas após o término do tratamento com quimioterápico (Lalla et al., 2008). Assim, o modelo caracterizado nesse trabalho simula algumas das alterações encontradas em pacientes, guardando paralelos temporais com a doença humana, embora que alterações histológicas intestinais mais discretas.

Ainda não há tratamento ou prevenção para a mucosite induzida por quimioterapia e o mecanismo de desenvolvimento da doença é pouco compreendido. Estudos recentes têm demonstrado a relevância do metabolismo microbiano na interação microbiota-hospedeiro (Natividad et al., 2018) em diferentes contextos, como na IBD (Islam et al., 2017). Na mucosite intestinal induzida por 5-FU, a administração de probióticos mostrou atenuar a disbiose (Tang et al., 2016) e inflamação causadas pela doença (Justino et al., 2015). Contudo, não há estudos que correlacionam AHR com a proteção contra mucosite intestinal induzida por quimioterápico. Assim, nossa hipótese é que ligantes de AHR provenientes do metabolismo de TRP derivado da microbiota promovam o controle da mucosite intestinal. De fato, nossos resultados sugerem que AHR exerce um papel protetor na resposta às alterações provocadas pelo quimioterápico. A deleção genética do receptor, assim como a inibição farmacológica de AHR com α -NF mostraram um aumento da susceptibilidade dos animais submetidos à quimioterapia. Em ambos os grupos, o peso corporal e escore clínico não retornaram aos níveis basais, conforme observado nos animais selvagens tratados apenas com 5-FU e veículo. Contudo, a elevação do índice de doença no grupo tratado com α -NF iniciou-se no dia 5, enquanto nos animais AHR^{-/-} esse aumento ocorreu no dia 10 do protocolo experimental. O infiltrado de neutrófilos no íleo apresentou um pico no dia 5, sendo restaurado no dia 8 do experimento, para todos os grupos avaliados. No entanto, não houve diferença entre esses grupos. Já em relação à disbiose, após a administração do quimioterápico, observou-se uma expansão de enterobactérias no

conteúdo luminal e íleo apenas dos animais AHR^{-/-}. Houve também expansão de bactérias ácido-láticas após a quimioterapia, no íleo dos animais AHR^{-/-} e dos animais selvagens tratados com α NF. Assim, AHR pode contribuir para o controle da disbiose durante a mucosite intestinal induzida por quimioterápico, embora não pareça estar envolvido no controle da inflamação intestinal associada à quimioterapia.

A atividade do α -NF é considerada dose-dependente e variável dependendo dos tecidos/células afetados, podendo atuar como agonista ou antagonista de AHR (Jin et al., 2014). Nosso objetivo no presente estudo foi utilizar α -NF como antagonista do receptor, a fim de comparar os resultados com aqueles obtidos com o animal AHR^{-/-}. Conforme citado anteriormente, a comparação da susceptibilidade desses animais sugere que o α -NF tem efeito antagonista, uma vez que mostrou um perfil de aumento do índice de doença e letalidade semelhantes ao AHR^{-/-}. Contudo, essa atividade ainda não foi comprovada. A maior susceptibilidade do AHR^{-/-} à lesão da mucosa intestinal é consistente com diversos estudos, nos quais a ausência desse receptor favorece o desenvolvimento de colite e tumorigênese colorretal (Díaz-Díaz et al., 2016; Metidji et al., 2018).

A expressão do AHR no intestino é ampla (Metidji et al., 2018) e sua ativação tem sido associada à ligação de metabólitos de TRP, os quais têm demonstrado atenuar doenças inflamatórias, como colite (Zelante et al., 2013; Islam et al., 2017) e síndrome metabólica (Natividad et al., 2018). O metabolismo de TRP pode ser dependente tanto das enzimas do hospedeiro, como a IDO1 que converte TRP em KYN, quanto da microbiota intestinal. Sendo assim, buscou-se determinar o papel de IDO1 na mucosite intestinal induzida por 5-FU. A análise da expressão de *Ido1* evidenciou que não houve aumento da expressão dessa enzima, como demonstrado em pacientes com IBD (Nikolaus et al., 2017). Além disso, os animais IDO1^{-/-} apresentaram menor escore clínico e baixa letalidade em relação aos animais WT após quimioterapia. Isso sugere que a via de metabolismo de TRP do hospedeiro não parece estar envolvida na ativação de AHR durante a mucosite intestinal pela via IDO1.

Para verificar a influência do metabolismo de TRP derivado da microbiota, foi avaliado o efeito da depleção de possíveis táxons produtores de metabólitos de TRP, como enterobactérias (Alexeev et al., 2018) e bactérias ácido-láticas (Zelante

et al., 2013). Os animais foram tratados com os antimicrobianos ciprofloxacino ou vancomicina ou ampicilina. O espectro de ação do ciprofloxacino consiste principalmente em bactérias Gram-negativo, como enterobactérias (Menezes-Garcia, 2015). Vancomicina atua sobre cocos Gram-positivo, como *Clostridium difficile* e outras bactérias no gênero *Clostridium* (Hasegawa et al., 2014), e ampicilina atua principalmente sobre Gram-positivo (Zelante et al., 2013). Geralmente, bactérias ácido-láticas são sensíveis à ampicilina e apresentam uma resistência intrínseca à vancomicina e ao ciprofloxacino (Nawaz et al., 2011). Nossos resultados mostraram um índice de doença pronunciado a partir do dia 5, com o pico no dia 10, apenas nos animais tratados com ampicilina. A exacerbação do índice de doença no grupo que recebeu ampicilina não parece estar associada ao aumento de enterobactérias, observado também no grupo tratado com vancomicina, mas à redução do conteúdo de bactérias ácido-láticas, presente somente neste grupo que recebeu 5-FU e ampicilina. Em conjunto, esses dados sugerem que bactérias ácido-láticas sensíveis a ampicilina são efetivas em controlar a resposta ao quimioterápico. A semelhança do padrão de resposta à quimioterapia de animais AHR^{-/-} e de animais tratados com ampicilina suporta a ideia que bactérias ácido-láticas protegem da quimioterapia, pela produção de metabólitos de TRP ligantes de AHR, como demonstrado em outros contextos (Zelante et al., 2013).

Conforme demonstrado por Zelante et al., (2013) a administração de lald atenua os sintomas de colite em modelo experimental. Assim, avaliou-se se a reposição desse ligante reverteria as alterações provocadas pela ampicilina em animais submetidos à quimioterapia. Observou-se que o tratamento com lald nos animais que receberam ampicilina e quimioterápico restaurou o peso corporal no dia 8 e o escore clínico nos dias 5 e 8 do experimento em relação ao grupo tratado com ampicilina e quimioterápico. Então, esses dados sugerem que repor esse metabólito de TRP é suficiente para reverter os efeitos do tratamento com ampicilina. No entanto, lald não promoveu alteração no conteúdo de bactérias ácido-láticas, assim como lald não foi capaz de interferir na disbiose observada nos animais tratados com ampicilina e que também está presente em AHR^{-/-}. Além disso, não se estabeleceu se lald influencia na resposta inflamatória, conforme demonstrado por Swimm et al., (2018), em que a administração da mesma dose desse metabólito em animais limitou a inflamação intestinal. Com isso, a fim de confirmar realmente se o

lald exerce seus efeitos benéficos via ativação de AHR, é necessário demonstrar a expressão desse receptor e dos genes induzidos por AHR nos diferentes grupos de animais WT submetidos ou não aos tratamentos com ampicilina e lald, além dos animais IDO1^{-/-}.

Sugere-se que quimioterapia leva à redução do metabolismo de TRP (Swimm et al., 2018), assim como durante a colite em modelo murino ou em humanos (Alexeev et al., 2018). Nesse contexto, diversos estudos avaliam os efeitos da reposição desses metabólitos. A administração de indol-3-piruvato (IPA) atenua a colite experimental, por meio da indução da subunidade de ligação ao ligante do receptor de IL-10 (IL-10R1), via ativação de AHR nas IEC. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que contribui para restaurar a integridade do epitélio intestinal, o que garante a homeostase imune da mucosa (Alexeev et al., 2018). A administração de indol também contribui para a função de barreira do intestino, a partir da expressão de moléculas do complexo juncional, o que resultou na diminuição da perda de peso corporal em animais submetidos à colite (Shimada et al., 2013). A manutenção da homeostase intestinal pela ativação de AHR também inclui a liberação de IL-22, que contribui para a integridade do epitélio e para a resistência contra infecções, devido à síntese de peptídeos antimicrobianos (Lee et al., 2011; Zelante et al., 2013). Em resumo, o papel do AHR está associado à regulação de citocinas pró-inflamatórias e à manutenção da integridade do epitélio, por meio da expressão de IL-22. Isso resulta na proteção contra colonização de patógenos (Zelante et al., 2013) e no controle da inflamação (Díaz-Díaz et al., 2016; Natividad et al., 2018). No entanto, a regulação desses mecanismos ainda precisa ser avaliada no presente sistema experimental, uma vez que o influxo de leucócitos para o íleo não parece ser alterado na ausência de AHR ou é até mesmo reduzido após tratamento com ampicilina, por meio do método empregado.

Além do relatado anteriormente, uma observação realizada durante os experimentos, mas que não foi demonstrada nesse trabalho, consistiu na presença de alterações macroscópicas no fígado entre os dias 8 e 10 após início da quimioterapia, as quais foram revertidas posteriormente. Essas alterações, sugestivas de lesão hepática, pareceram ser mais pronunciadas nos animais AHR^{-/-} ou tratados com α -NF. Estudos demonstram que a quimioterapia pode provocar lesão hepática induzida por medicamentos (DILI), que está associada a uma elevada

morbidade e mortalidade (Bahirwani e Reddy, 2014). Geralmente, a DILI é idiossincrática, possivelmente causada pela geração de metabólitos provenientes de reações de oxidação de fase I, que causam lesão no sistema imune ou danos funcionais nas mitocôndrias (Bahirwani e Reddy, 2014; Vincenzi et al., 2018). O fármaco acetaminofeno também é descrito como hepatotóxico em doses elevadas. Em um estudo recente, foi demonstrado o papel de SOCS2 na modulação da resposta inflamatória exacerbada e redução da necrose no fígado, após lesão hepática induzida por uma dose tóxica do acetaminofeno (Monti-Rocha et al., 2019). De forma análoga, propõe-se avaliar o efeito hepatoprotetor do AHR após o tratamento com quimioterápico, uma vez que SOCS2 pode ser induzida por AHR (Barroso et al., 2016).

Em resumo, nossos resultados sugerem um potencial papel dos metabólitos de TRP no controle dos efeitos causados pela quimioterapia via ativação de AHR. No entanto, ainda é necessário confirmar a expressão de genes sinalizadores da ativação de AHR durante a cinética do tratamento com 5-FU e após administração de lald nos grupos que receberam ou não ampicilina. Além da análise da ativação de AHR em animais WT, também é preciso avaliar a expressão gênica em animais IDO1^{-/-} tratados com lald para verificar se essa ativação do receptor realmente não depende do metabolismo de TRP pela via do hospedeiro. Além disso, como perspectiva, pretende-se estudar o controle da hepatotoxicidade como potencial mecanismo desencadeado por AHR e envolvido na regulação da resposta à quimioterapia. Assim, esse trabalho apresenta resultados preliminares que fundamentam as análises futuras, para demonstrar o mecanismo de ativação de AHR por metabólitos microbianos de TRP e suas atividades no controle dos efeitos adversos provocados por quimioterápicos.

7 REFERÊNCIAS

Alexeev EE, Lanis JM, Kao DJ, Campbell EL, Kelly CJ, Battista KD, Gerich ME, Jenkins BR, Walk ST, Kominsky DJ, Colgan SP. Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *Am J Pathol.* 2018 May;188(5):1183-1194.

Bahirwani R, Reddy KR. Drug-induced liver injury due to cancer chemotherapeutic agents. *Semin Liver Dis.* 2014 May;34(2):162-71.

Barroso A, Gualdrón-López M, Esper L, Brant F, Araújo RR, Carneiro MB, Ávila TV, Souza DG, Vieira LQ, Rachid MA, Tanowitz HB, Teixeira MM, Machado FS. The Aryl Hydrocarbon Receptor Modulates Production of Cytokines and Reactive Oxygen Species and Development of Myocarditis during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infect Immun.* 2016 Sep 19;84(10):3071-82.

Blacher E, Levy M, Tatrovsky E, Elinav E. Microbiome-Modulated Metabolites at the Interface of Host Immunity. *J Immunol.* 2017 Jan 15;198(2):572-580.

Cani PD, Knauf C. How gut microbes talk to organs: The role of endocrine and nervous routes. *Mol Metab.* 2016;5(9):743-52. Published 2016 May 27.

Celiberto LS, Graef FA, Healey GR, Bosman ES, Jacobson K, Sly LM, Vallance BA. Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. *Immunology.* 2018 Sep;155(1):36-52.

Díaz-Díaz CJ, Ronnekleiv-Kelly SM, Nukaya M, Geiger PG, Balbo S, Dator R, Megna BW, Carney PR, Bradfield CA, Kennedy GD. The Aryl Hydrocarbon Receptor is a Repressor of Inflammation-associated Colorectal Tumorigenesis in Mouse. *Ann Surg.* 2016 Sep;264(3):429-36.

El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci.* 2009 Jun 28;5(5):466-73.

Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T. Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science*. 2002 Nov 15;298(5597):1424-7.

Fagundes CT, Souza DG, Nicoli JR, Teixeira MM. Control of host inflammatory responsiveness by indigenous microbiota reveals an adaptive component of the innate immune system. *Microbes Infect*. 2011 Dec;13(14-15):1121-32.

Fijlstra M, Ferdous M, Koning AM, Rings EH, Harmsen HJ, Tissing WJ. Substantial decreases in the number and diversity of microbiota during chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis in a rat model. *Support Care Cancer*. 2015 Jun;23(6):1513-22.

Focaccetti C, Bruno A, Magnani E, Bartolini D, Principi E, Dallaglio K, Bucci EO, Finzi G, Sessa F, Noonan DM, Albini A. Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ROS production in endothelial cells and cardiomyocytes. *PLoS One*. 2015 Feb 11;10(2):e0115686.

Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor. *Immunity*. 2018 Jan 16;48(1):19-33.

Hamouda N, Sano T, Oikawa Y, Ozaki T, Shimakawa M, Matsumoto K, Amagase K, Higuchi K, Kato S. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017 Sep;121(3):159-168.

Hasegawa M, Yada S, Liu MZ, Kamada N, Muñoz-Planillo R, Do N, Núñez G, Inohara N. Interleukin-22 regulates the complement system to promote resistance against pathobionts after pathogen-induced intestinal damage. *Immunity*. 2014 Oct 16;41(4):620-32.

Hubbard TD, Murray IA, Perdew GH. Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metab Dispos*. 2015 Oct;43(10):1522-35.

Islam J, Sato S, Watanabe K, Watanabe T, Ardiansyah, Hirahara K, Aoyama Y, Tomita S, Aso H, Komai M, Shirakawa H. Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice. *J Nutr Biochem*. 2017 Apr;42:43-50.

Jang JY, Shin S, Choi BI, Park D, Jeon JH, Hwang SY, Kim JC, Kim YB, Nahm SS. Antiteratogenic effects of alpha-naphthoflavone on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposed mice in utero. *Reprod Toxicol*. 2007 Nov-Dec;24(3-4):303-9. Epub 2007 Aug 19.

Jin UH, Lee SO, Sridharan G, Lee K, Davidson LA, Jayaraman A, Chapkin RS, Alaniz R, Safe S. Microbiome-derived tryptophan metabolites and their aryl hydrocarbon receptor-dependent agonist and antagonist activities. *Mol Pharmacol*. 2014 May;85(5):777-88.

Julliard W, Fechner JH, Mezrich JD. The aryl hydrocarbon receptor meets immunology: friend or foe? A little of both. *Front Immunol*. 2014 Oct 2;5:458.

Justino PF, Melo LF, Nogueira AF, Costa JV, Silva LM, Santos CM, Mendes WO, Costa MR, Franco AX, Lima AA, Ribeiro RA, Souza MH, Soares PM. Treatment with *Saccharomyces boulardii* reduces the inflammation and dysfunction of the gastrointestinal tract in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Br J Nutr*. 2014 May;111(9):1611-21.

Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am*. 2008;52(1):61-77, viii.

Lee JH, Wood TK, Lee J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends Microbiol*. 2015 Nov;23(11):707-18.

Li HL, Lu L, Wang XS, et al. Alteration of Gut Microbiota and Inflammatory Cytokine/Chemokine Profiles in 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:455. Published 2017 Oct 26.

Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology*. 2017;18:2.

Machado FS, Johndrow JE, Esper L, Dias A, Bafica A, Serhan CN, Aliberti J. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med*. 2006;12:330-334.

Menezes-Garcia, Zélia. O papel da microbiota na mucosite induzida por 5-FU. 109 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

Metidji A, Omenetti S, Crotta S, Li Y, Nye E, Ross E, Li V, Maradana MR, Schiering C, Stockinger B. The Environmental Sensor AHR Protects from Inflammatory Damage by Maintaining Intestinal Stem Cell Homeostasis and Barrier Integrity. *Immunity*. 2018 Aug 21;49(2):353-362.e5.

Molloy MJ, Grainger JR, Bouladoux N, Hand TW, Koo LY, Naik S, Quinones M, Dzutsev AK, Gao JL, Trinchieri G, Murphy PM, Belkaid Y. Intraluminal containment of commensal outgrowth in the gut during infection-induced dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 2013 Sep 11;14(3):318-28.

Montassier E, Gastinne T, Vangay P, Al-Ghalith GA, Bruley des Varannes S, Massart S, Moreau P, Potel G, de La Cochetière MF, Batard E, Knights D. Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 Sep;42(5):515-28.

Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, Sica G, Sileri P, Biancone L, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):237-48, 248.

Monti-Rocha R, Cramer A, Gaio Leite P, Antunes MM, Pereira RVS, Barroso A, Queiroz-Junior CM, David BA, Teixeira MM, Menezes GB, Machado FS. SOCS2 Is Critical for the Balancing of Immune Response and Oxidate Stress Protecting Against Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury. *Frontiers in Immunology*. 2019 Jan; 9:3134.

Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, Bogunovic M, Spencer SP, Belkaid Y, Merad M. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science*. 2014 Mar 28;343(6178):1249288.

Natividad JM, Agus A, Planchais J, Lamas B, Jarry AC, Martin R, Michel ML, Chong-Nguyen C, Roussel R, Straube M, Jegou S, McQuitty C, Le Gall M, da Costa G, Lecornet E, Michaudel C, Modoux M, Glodt J, Bridonneau C, Sovran B, Dupraz L, Bado A, Richard ML, Langella P, Hansel B, Launay JM, Xavier RJ, Duboc H, Sokol H. Impaired Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Production by the Gut Microbiota Is a Key Factor in Metabolic Syndrome. *Cell Metab*. 2018 Nov 6;28(5):737-749.e4.

Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X, Moore JE, Millar BC, Xu J. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Curr Microbiol*. 2011 Mar;62(3):1081-9.

Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, Thieme F, Schulte DM, Bethge J, Rehman A, Tran F, Aden K, Häsler R, Moll N, Schütze G, Schwarz MJ, Waetzig GH, Rosenstiel P, Krawczak M, Szymczak S, Schreiber S. Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017 Dec;153(6):1504-1516.e2.

Pedroso SH, Vieira AT, Bastos RW, Oliveira JS, Cartelle CT, Arantes RM, Soares PM, Generoso SV, Cardoso VN, Teixeira MM, Nicoli JR, Martins FS. Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. *Microbiology*. 2015 Oct;161(10):1950-60.

Peres AG, Zamboni R, King IL, Madrenas J. Suppression of CYP1 members of the AHR response by pathogen-associated molecular patterns. *J Leukoc Biol*. 2017 Dec;102(6):1471-1480.

Ramanan D, Cadwell K. Intrinsic Defense Mechanisms of the Intestinal Epithelium. *Cell Host Microbe*. 2016 Apr 13;19(4):434-41.

Ribeiro RA, Wanderley CW, Wong DV, Mota JM, Leite CA, Souza MH, Cunha FQ, Lima-Júnior RC. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Nov;78(5):881-893. Epub 2016 Sep 2. Review.

Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun.* 2018 Aug 17;9(1):3294. doi: 10.1038/s41467-018-05470-4. Review.

Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016 May 27;16(6):341-52.

Schiering C, Vonk A, Das S, Stockinger B, Wincent E. Cytochrome P4501-inhibiting chemicals amplify aryl hydrocarbon receptor activation and IL-22 production in T helper 17 cells. *Biochem Pharmacol.* 2018 May;151:47-58.

Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med.* 2016 Oct 6;22(10):1079-1089.

Seo HW, Kim DY, Kwon DY, Kwon JS, Jin LM, Lee B, Kim JH, Min BH, Kim MS. Injectable intratumoral hydrogel as 5-fluorouracil drug depot. *Biomaterials.* 2013 Apr;34(11):2748-57. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.006. Epub 2013 Jan 21.

Shimada Y, Kinoshita M, Harada K, et al. Commensal bacteria-dependent indole production enhances epithelial barrier function in the colon. *PLoS One.* 2013;8(11):e80604. Published 2013 Nov 20.

Singh K, Bhorl M, Kasu YA, Bhat G, Marar T. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity - Exploring the armoury of obscurity. *Saudi Pharm J.* 2018 Feb;26(2):177-190.

Sonis ST. A biological approach to mucositis. *J Support Oncol.* 2004 Jan-Feb;2(1):21-32; discussion 35-6. Review. PubMed PMID: 15330370.

Souza DG, Fagundes CT, Amaral FA, Cisalpino D, Sousa LP, Vieira AT, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Fierro IM, Teixeira MM. The required role of endogenously produced lipoxin A4 and annexin-1 for the production of IL-10 and inflammatory hyporesponsiveness in mice. *J Immunol.* 2007 Dec 15;179(12):8533-43.

Souza DG, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):4137-46.

Soveri LM, Hermunen K, de Gramont A, Poussa T, Quinaux E, Bono P, André T, Österlund P. Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: Is efficacy an impact of toxicity? *Eur J Cancer*. 2014 Nov;50(17):2966-74.

Steinmeyer S, Lee K, Jayaraman A, Alaniz RC. Microbiota metabolite regulation of host immune homeostasis: a mechanistic missing link. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015 May;15(5):24.

Swimm A, Giver CR, DeFilipp Z, Rangaraju S, Sharma A, Ulezko Antonova A, Sonowal R, Capaldo C, Powell D, Qayed M, Kalman D, Waller EK. Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease. *Blood*. 2018 Dec 6;132(23):2506-2519. doi: 10.1182/blood-2018-03-838193. Epub 2018 Sep 26.

Tang Y, Wu Y, Huang Z, Dong W, Deng Y, Wang F, Li M, Yuan J. Administration of probiotic mixture DM#1 ameliorated 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis and dysbiosis in rats. *Nutrition*. 2017 Jan;33:96-104.

Takamura T, Harama D, Matsuoka S, Shimokawa N, Nakamura Y, Okumura K, Ogawa H, Kitamura M, Nakao A. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Immunol Cell Biol*. 2010 Aug;88(6):685-9.

Vasconcelos RM, Sanfilippo N, Paster BJ, Kerr AR, Li Y, Ramalho L, Queiroz EL, Smith B, Sonis ST, Corby PM. Host-Microbiome Cross-talk in Oral Mucositis. *J Dent Res*. 2016 Jul;95(7):725-33.

Vincenzi B, Russo A, Terenzio A, Galvano A, Santini D, Vorini F, Antonelli-Incalzi R, Vespasiani-Gentilucci U, Tonini G. The use of SAME in chemotherapy-induced liver injury. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018 Oct;130:70-77.

Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, Karamanolis G, Papatheodoridis G, Tzathas C, et al. Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2017 Jan;12(1): e0170034.

Winter SE, Bäumlér AJ. Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. *Gut Microbes*. 2014;5(1):71-3.

Wischmeyer PE, McDonald D, Knight R. Role of the microbiome, probiotics, and 'dysbiosis therapy' in critical illness. *Curr Opin Crit Care*. 2016 Aug;22(4):347-53.

Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):372-85.

Zelante T, Iannitti RG, Fallarino F, et al. Tryptophan Feeding of the IDO1-AhR Axis in Host-Microbial Symbiosis. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:640.

Zhang N, Yin Y, Xu SJ, Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules*. 2008 Aug 5;13(8):1551-69. Review.

Zhang W, Feng M, Zheng G, Chen Y, Wang X, Pen B, Yin J, Yu Y, He Z. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via upregulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 13;417(2):679-85.

Zuo T, Ng SC. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol*. 2018;9:2247. Published 2018 Sep 25.