

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

Rafaela Ribeiro Álvares Batista

**IMPACTOS DO METABOLISMO DO TRIPTOFANO NA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA**

Belo Horizonte – MG
2023
Versão corrigida

Rafaela Ribeiro Álvares Batista

**IMPACTOS DO METABOLISMO DO TRIPTOFANO NA MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.

Belo Horizonte – MG
2023
Versão corrigida

043

Batista, Rafaela Ribeiro Álvares.

Impactos do metabolismo de triptofano na mucosite intestinal induzida por quimioterapia [manuscrito] / Rafaela Ribeiro Álvares Batista. – 2023.
117 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes.

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

1. Microbiologia. 2. Mucosite. 3. Fluoruracila. 4. Triptofano. 5. Hidrocarbonetos Aromáticos. 6. Microbioma Gastrointestinal. 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
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE RAFAELA RIBEIRO ALVARES BATISTA

Nº REGISTRO: 2019704778

Às 14:00 horas do dia 03 de maio de 2023, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Flaviano dos Santos Martins (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Liliene Martins dos Santos (Faculdade de Farmácia/UFMG), Caroline Marcantonio Ferreira (UNIFESP), Sávio Henrique de Cicco Sandes (Unicamp) e o Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes (Orientadora), para julgar o trabalho final "Impactos do metabolismo do triptofano na mucosite intestinal induzida por quimioterapia" da aluna Rafaela Ribeiro Alvares Batista, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 03 de maio de 2023

Membros da Banca:

Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Profa. Dra. Liliene Martins dos Santos

Profa. Dra. Caroline Marcantonio Ferreira

Prof. Dr. Sávio Henrique de Cicco Sandes

De acordo:

Prof. Dr. Caio Tavares Fagundes

(Orientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Caio pela oportunidade, dedicação, pelo aprendizado, incentivo e pela grande contribuição para o meu crescimento profissional como pesquisadora, durante esse período de orientação acadêmica. À banca avaliadora pela disponibilidade e contribuições dadas ao meu trabalho.

À CAPES (processo 88882.348380/2010-1), agradeço pela concessão da bolsa, que possibilitou minha dedicação exclusiva ao projeto de pesquisa. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG – APQ 00897-22) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Dengue e Interação Microrganismo-hospedeiro, agradeço pelo financiamento deste estudo.

Aos amigos e colegas do LIMHO e do grupo de Imunofarmacologia, obrigada pelo companheirismo, pela convivência, pelos momentos de descontração, pelo trabalho em equipe e aprendizado, vocês tornaram essa jornada mais leve e prazerosa.

Aos colaboradores que auxiliaram na realização e análise da determinação das concentrações de metabólitos de triptofano e do sequenciamento do DNA 16S.

Aos professores dos laboratórios, cientistas exemplares, obrigada pelos ensinamentos. Às técnicas do laboratório que auxiliam nosso trabalho e a rotina laboratorial.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, incentivo e por nunca medirem esforços para a concretização dos meus sonhos e a toda minha família pela força e torcida.

Enfim, obrigada a todos que me acompanharam nessa trajetória, cada um de vocês contribuiu para esta conquista, que vem sendo construída ao longo desses quatro 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 de triptofano (TRP) na atenuação de doenças inflamatórias intestinais (IBD), via ativação do receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR). Nosso objetivo foi avaliar o papel dos metabólitos de TRP e da ativação de AHR na resposta à mucosite intestinal. Após o tratamento com 5-FU, houve alteração da concentração de quinurenina (KYN), sintetizada a partir do TRP pela enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1), e dos metabólitos microbianos de TRP, concomitante à alteração da atividade de AHR. Os animais deficientes em AHR (*Ahr*^{-/-}) apresentaram maior susceptibilidade à mucosite intestinal, aumento da lesão tecidual e da permeabilidade intestinal, simultânea à maior translocação bacteriana de cocos Gram-positivo, em relação aos animais selvagens (WT). O tratamento com um metabólito microbiano de TRP, potencial ligante de AHR, protegeu da letalidade induzida pelo 5-FU, porém, não inibiu o aumento de permeabilidade intestinal ou translocação bacteriana. A expressão de um gene-alvo da ativação de AHR, enzima do citocromo P450 da família 1, subfamília A polipeptídeo 1 (*Cyp1a1*), é reduzida no intestino de animais deficientes em IDO1 (*Ido1*^{-/-}). Animais *Ido1*^{-/-} também apresentaram maior susceptibilidade à mucosite intestinal, acompanhada de uma expressiva permeabilidade intestinal, menor expressão de genes de barreira em relação aos animais WT, alteração do metabolismo microbiano de TRP e da composição da microbiota intestinal em relação aos animais WT submetidos à mucosite, incluindo gêneros de bactérias que contribuem para a função de barreira intestinal. Após sugerir um papel protetor dos metabólitos de TRP e de AHR na mucosite, foi avaliado o papel de Supressores da sinalização de citocinas 2 (SOCS2), que é uma proteína induzida por AHR e associada ao controle de doenças inflamatórias. Houve redução na expressão de *Socs2* no intestino de animais WT simultaneamente ao comprometimento da integridade do epitélio intestinal e da função de barreira, além de uma menor expressão desse gene nos animais *Ido1*^{-/-}. Os animais deficientes em SOCS2 (*Socs2*^{-/-}) apresentaram maior susceptibilidade à mucosite, que foi associada à maior lesão tecidual e permeabilidade intestinal, menor expressão de genes de barreira e maior translocação bacteriana. Em conjunto, o metabolismo de TRP e a ativação de AHR desempenham um papel indispensável na proteção da mucosite intestinal induzida por 5-FU, por controlar a lesão tecidual, a função de barreira e a translocação bacteriana.

Palavras-chave: Mucosite intestinal, Fluoruracil (5-FU), metabólitos de triptofano, receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AHR), microbiota intestinal.

ABSTRACT

Intestinal mucositis is a frequent adverse effect in patients undergoing chemotherapy, such as with 5-Fluorouracil (5-FU), which may result in discontinuation of treatment. Previous studies suggest the importance of tryptophan metabolites (TRP) in the attenuation of inflammatory bowel diseases (IBD), via activation of the aromatic hydrocarbon receptor (AHR). Our aim was to evaluate the role of TRP metabolites and AHR activation in the response to intestinal mucositis. After treatment with 5-FU, there was a change in the concentration of kynurenine (KYN), synthesized from TRP by the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), and in the microbial metabolites of TRP, concomitant with the change in AHR activity. Animals deficient in AHR (*Ahr*^{-/-}) showed greater susceptibility to mucositis, increased tissue damage and intestinal permeability, simultaneously with greater bacterial translocation of Gram-positive cocci, compared to wild animals (WT). Treatment with a microbial TRP metabolite, potential AHR ligand, protected against 5-FU-induced lethality, however, did not inhibit the increase in intestinal permeability or bacterial translocation. Expression of an AHR activation target gene, cytochrome P450 enzyme family 1, subfamily A, polypeptide 1 (*Cyp1a1*), is reduced in the gut of IDO1-deficient animals (*Ido1*^{-/-}). *Ido1*^{-/-} animals also showed greater susceptibility to mucositis, accompanied by an expressive intestinal permeability, lower expression of barrier genes in relation to WT animals, alteration of the microbial metabolism of TRP and microbiota composition in relation to WT animals submitted to mucositis, including genera of bacteria that contribute to intestinal barrier function. After suggesting a protective role for TRP and AHR metabolites in mucositis, the role of Cytokine Signaling Suppressors 2 (SOCS2), which is a protein induced by AHR and associated with the control of inflammatory diseases, was evaluated. There was a reduction in the expression of *Socs2* in the intestine of WT animals, simultaneously with the impairment of the integrity of the intestinal epithelium and the barrier function, in addition to a lower expression of this gene in the *Ido1*^{-/-} animals. Animals deficient in SOCS2 (*Socs2*^{-/-}) showed greater susceptibility to mucositis, which was associated with greater tissue damage and intestinal permeability, lower expression of barrier genes and greater bacterial translocation. Together, TRP metabolism and AHR activation play an indispensable role in protecting against 5-FU-induced intestinal mucositis by controlling tissue damage, barrier function, and bacterial translocation.

Keywords: Intestinal mucositis, Fluoruracil (5-FU), tryptophan metabolites, aryl hydrocarbon receptor (AHR), gut microbiota.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA AO LONGO DO INTESTINO	20
FIGURA 2- FUNÇÃO DE BARREIRA INTESTINAL, MICROBIOTA E DISBIOSE..	20
FIGURA 3- MECANISMO DE AÇÃO DO 5-FLUOROURACIL	22
FIGURA 4- FISIOPATOLOGIA DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FLUOROURACIL	24
FIGURA 5- VIAS DO METABOLISMO DE TRIPTOFANO.....	28
FIGURA 6- MECANISMO DE ATIVAÇÃO DE AHR MEDIADA POR LIGANTE.....	35
FIGURA 7- PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE O CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU.....	33
FIGURA 8 - CARACTERIZAÇÃO DO SCORE CLÍNICO.	37
FIGURA 9- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA A ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, CLÍNICAS E MORTE	48
FIGURA 10- ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS INDUZIDAS POR 5-FU	49
FIGURA 11- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA AO AUMENTO TRANSITÓRIO DA ATIVIDADE DE MPO NO INTESTINO..	50
FIGURA 12- ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO TECIDO DO ÍLEO DE ANIMAIS SELVAGENS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM 5-FU	50
FIGURA 13- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA AO AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL	51
FIGURA 14- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À MANUTENÇÃO DA FUNÇÃO DE BARREIRA DO INTESTINO DURANTE O CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	52
FIGURA 15- CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM 5-FU POR CULTIVO EM MEIOS SELETIVOS	52
FIGURA 16- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA A ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA MICROBIOTA FECAL DE CAMUNDONGOS NO OITAVO DIA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	54
FIGURA 17- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA A AUMENTO SIGNIFICATIVO DO CONTEÚDO RELATIVO DE <i>AKKERMANSIA MUCINIPHILA</i> , <i>HELICOBACTER HEPATICUS</i> E <i>BACTEROIDES</i> SP.	55
FIGURA 18- TRATAMENTO COM 5-FU INDUZ TRANSLOCAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS PARA O FÍGADO	55
FIGURA 19- EXPOSIÇÃO À AMPICILINA REDUZ O CONTEÚDO DE GRUPOS BACTERIANOS AERÓBIOS NAS FEZES DE ANIMAIS TRATADOS COM 5-FU.....	56
FIGURA 20- AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, CLÍNICOS E DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA APÓS TRATAMENTO COM AMPICILINA DE ANIMAIS SUBMETIDOS À QUIMIOTERAPIA COM 5-FU.....	57
FIGURA 21- AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM AMPICILINA NA LESÃO INTESTINAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL.....	58
FIGURA 22- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MPO APÓS TRATAMENTO COM AMPICILINA DE ANIMAIS SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL.....	59
FIGURA 23- TRATAMENTO COM AMPICILINA REDUZ A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O FÍGADO	59
FIGURA 24- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA A ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE TRP E DE SEUS METABÓLITOS.....	61
FIGURA 25- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA A ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRP E DE SEUS METABÓLITOS NO ÍLEO.....	61

FIGURA 26- AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CLÍNICOS EM ANIMAIS <i>LACZ^{XRE}</i> DURANTE O CURSO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	61
FIGURA 27- ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO TECIDO DO ÍLEO DE ANIMAIS <i>LACZ^{XRE}</i> SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL.....	62
FIGURA 28- ANÁLISE DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O FÍGADO DE ANIMAIS <i>LACZ^{XRE}</i> SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL.....	62
FIGURA 29- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE BETA-GALACTOSIDASE EM FRAGMENTOS DE FÍGADO OU ÍLEO DE ANIMAIS <i>LACZ^{XRE}</i>	63
FIGURA 30- AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, CLÍNICOS E DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE ANIMAIS <i>AHR^{-/-}</i> SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	64
FIGURA 31- AVALIAÇÃO DA LESÃO INTESTINAL NO INTESTINO EM ANIMAIS <i>AHR^{-/-}</i> APÓS TRATAMENTO COM 5-FU	66
FIGURA 32- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MPO NO INTESTINO EM ANIMAIS <i>AHR^{-/-}</i> APÓS TRATAMENTO COM 5-FU	67
FIGURA 33- AVALIAÇÃO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL DE ANIMAIS <i>AHR^{-/-}</i> NO QUINTO DIA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL, POR MEIO DO ENSAIO DE AZUL DE EVANS.....	68
FIGURA 34- ANÁLISE DA TRANSLOCAÇÃO DE BACTÉRIAS INTESTINAIS PARA O FÍGADO EM ANIMAIS WT OU <i>AHR^{-/-}</i> APÓS TRATAMENTO COM 5-FU.	68
FIGURA 35- AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TRATAMENTO COM UM AGONISTA DE AHR NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, CLÍNICOS E NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA APÓS QUIMIOTERAPIA COM 5-FU.	70
FIGURA 36- ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS APÓS O TRATAMENTO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU COM UM AGONISTA DE AHR.....	71
FIGURA 37- ANÁLISE DA ATIVIDADE DE MPO APÓS O TRATAMENTO COM UM METABÓLITO DE TRP MICROBIANO, EM ANIMAIS WT SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL	72
FIGURA 38- ANÁLISE DA PERMEABILIDADE INTESTINAL INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA COM 5-FU APÓS O TRATAMENTO COM UM AGONISTA DE AHR	73
FIGURA 39- ANÁLISE DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O FÍGADO DE ANIMAIS WT, APÓS O TRATAMENTO COM UM AGONISTA DE AHR.....	73
FIGURA 40- TRATAMENTO COM 5-FU ALTERA A EXPRESSÃO DO GENE <i>Ido1</i> EM CAMUNDONGOS WT.	74
FIGURA 41- ANIMAIS <i>Ido1^{-/-}</i> APRESENTAM DIMINUIÇÃO DA RAZÃO KYN/TRP NO PLASMA E NO ÍLEO APÓS QUIMIOTERAPIA COM 5-FU.....	75
FIGURA 42- EXPRESSÃO DE <i>CYP1A1</i> NO ÍLEO DE ANIMAIS SELVAGENS E <i>Ido1^{-/-}</i> APÓS QUIMIOTERAPIA COM 5-FU..	75
FIGURA 43- ANIMAIS <i>Ido1^{-/-}</i> SÃO MAIS SUSCEPTÍVEIS À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR 5-FU	76
FIGURA 44- ANÁLISE DA LESÃO INTESTINAL NO TECIDO DO ÍLEO EM ANIMAIS <i>Ido1^{-/-}</i> SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL POR 5-FU	77
FIGURA 45- ANÁLISE DA ATIVIDADE DE MPO NO TECIDO DO ÍLEO EM ANIMAIS <i>Ido1^{-/-}</i> SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL POR 5-FU	78
FIGURA 46- ANIMAIS <i>Ido1^{-/-}</i> APRESENTAM AUMENTO DA PERMEABILIDADE INTESTINAL APÓS QUIMIOTERAPIA....	79
FIGURA 47- AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FUNÇÃO DE BARREIRA INTESTINAL EM ANIMAIS <i>Ido1^{-/-}</i> APÓS QUIMIOTERAPIA COM 5-FU.....	79

FIGURA 48- AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM ANIMAIS <i>Ido1</i> ^{-/-} APÓS QUIMIOTERAPIA COM 5-FU	78
FIGURA 49- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA A ALTERAÇÕES NA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA FECAL DE CAMUNDONGOS <i>Ido1</i> ^{-/-} NO OITAVO DIA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL	80
FIGURA 50- TRATAMENTO COM 5-FU LEVA A ALTERAÇÕES DE ABUNDANCIA RELATIVA DE DIFERENTES ESPÉCIES BACTERIANAS NOS ANIMAIS <i>Ido1</i> ^{-/-}	83
FIGURA 51- ANIMAIS <i>Ido1</i> ^{-/-} APRESENTAM ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE METABÓLITOS MICROBIANOS DE TRP APÓS TRATAMENTO COM 5-FU	84
FIGURA 52- AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, CLÍNICOS E DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA APÓS A EXPOSIÇÃO A AMPICILINA DE ANIMAIS WT OU <i>Ido1</i> ^{-/-} SUBMETIDOS AO MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL.	86
FIGURA 53- TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA PARA O FÍGADO APÓS A EXPOSIÇÃO A AMPICILINA EM ANIMAIS WT OU <i>Ido1</i> ^{-/-} SUBMETIDOS AO MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL.....	86
FIGURA 54- ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>SoCS2</i> NO TECIDO DO ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR QUIMIOTERAPIA	87
FIGURA 55- ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, CLÍNICOS E NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA EM ANIMAIS <i>SoCS2</i> ^{-/-} SUBMETIDOS AO PROTOCOLO DE QUIMIOTERAPIA COM 5-FU	88
FIGURA 56- AVALIAÇÃO DA LESÃO INTESTINAL NO INTESTINO EM ANIMAIS <i>SoCS2</i> ^{-/-} APÓS TRATAMENTO COM 5-FU	89
FIGURA 57- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE MPO NO INTESTINO EM ANIMAIS <i>SoCS2</i> ^{-/-} APÓS TRATAMENTO COM 5-FU.....	90
FIGURA 58- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AZUL DE EVANS NOS TECIDOS DE ANIMAIS <i>SoCS2</i> ^{-/-} TRATADOS COM 5-FU.....	91
FIGURA 59- AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À FUNÇÃO DE BARREIRA INTESTINAL EM ANIMAIS <i>SoCS2</i> ^{-/-} APÓS QUIMIOTERAPIA COM 5-FU	91
FIGURA 60- AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA EM ANIMAIS <i>SoCS2</i> ^{-/-} APÓS QUIMIOTERAPIA COM 5-FU	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
AHR	Receptor de hidrocarbonetos aromáticos
<i>Ahr</i> ^{-/-}	Camundongos deficientes em AHR
<i>Ahrr</i>	Gene repressor de AHR
ARNT	Translocador nuclear de AHR
BHI	Agar Infusão Cérebro e Coração
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA/UFMG	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais
CMC	Carboximetilcelulose
CXCL1	Quimiocina motivo C-X-C ligante 1
CYP1A1	Enzima do citocromo P450 da família 1, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP1A2	Enzima do citocromo P450 da família 1, subfamília A, polipeptídeo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FdUMP	Monofosfato de fluorodeoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodesoxiuridina
FUTP	Trifosfato de fluorouridina
GALTs	Tecidos linfoides associados ao intestino
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GF	Camundongos isentos de germes
I3C	Indol-3-carbinol
IAA	Ácido indol-3-acético
IaId	Indol-3-aldeído
IBD	Doenças inflamatórias intestinais

I3C	Indol-3-carbinol
IAA	Ácido indol-3-acético
IaId	Indol-3-aldeído
IBD	Doenças inflamatórias intestinais
IDO1	Indoleamina 2,3-dioxigenase 1
<i>Ido1</i> ^{-/-}	Camundongos deficientes em IDO1
IECs	Células epiteliais intestinais
IgA	Imunoglobulina A
ILA	Ácido indol-3-láctico
IL1 β	Interleucina1 beta
IL6	Interleucina6
IL10	Interleucina10
IL18	Interleucina18
IL22	Interleucina22
IL33	Interleucina33
ILC3	Células linfoides inatas do grupo 3
i.p	Intraperitoneal
IPA	Indol-3-ácido propiônico
I3S	Indoxil-sulfato
KYN	Quinurenina
LacZ ^{XRE}	Animais repórter para ativação de AHR
MH	Ágar Muller-Hinton
MPO	Enzima mieloperoxidase
MRS	Ágar de Man, Rogosa e Sharpe
Myd-88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NRF2	Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-Galactosídeo
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Salina tamponada por fosfato
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
REGIII γ	Proteína de regeneração derivada de ilhotas gama 3
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SCFA	Ácidos graxos de cadeia curta
SOCS	Supressores da sinalização de citocinas
<i>Socs2</i> ^{-/-}	Animais deficientes em SOCS2
Th17	Células T auxiliares tipo 17
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
TRP	Triptofano
U.A	Unidades arbitrárias
UFCs	Unidades formadoras de colônias
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas
WT	Selvagem
XRE	Elemento responsivo a xenobióticos
Zo-1	Zona-ocludinas
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
g/L	Gramas por litro
mg/kg	Miligramas por quilograma de peso
p/v	Peso/Volume

SUMÁRIO

1	JUSTIFICATIVA.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 Microbiota, disbiose e mucosite intestinal induzida por 5-FU	17
	2.2 Metabolismo de Triptofano e microbiota intestinal.....	26
	2.3 Metabolismo de Triptofano e AHR	28
3	OBJETIVOS.....	33
	3.1 Objetivo geral	33
	3.2 Objetivos específicos	33
4	METODOLOGIA	33
	4.1 Animais.....	33
	4.2 Tratamentos	34
	4.3 Protocolo experimental e parâmetros avaliados	35
	4.4 Determinação do escore clínico	36
	4.5 Contagem total de leucócitos no sangue.....	37
	4.6 Análise histológica.....	37
	4.7 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	38
	4.8 Determinação da concentração de citocinas por ELISA	38
	4.9 Composição da microbiota	39
	4.10 Translocação bacteriana para o fígado.....	40
	4.11 Análise da permeabilidade intestinal	40
	4.12 Avaliação da atividade de AHR em animais repórter (<i>LacZ^{XRE}</i>).....	42
	4.13 Dosagem de metabólitos de triptofano - UPLC-MS.....	43
	4.14 Análise da expressão de genes.....	45
	4.15 Análise Estatística.....	46
5	RESULTADOS.....	47
6	DISCUSSÃO.....	93
7	REFERÊNCIAS	102

1 JUSTIFICATIVA

A quimioterapia com 5-FU é amplamente utilizada no tratamento de diversos tumores sólidos, como no câncer colorretal, e está associada a uma taxa de incidência de mucosite intestinal de aproximadamente 50-80% (Zhang N et al., 2008; Vanlancker et al., 2017). A mucosite intestinal é caracterizada pelos sintomas de diarreia, náusea, vômito, dor abdominal, desnutrição, podendo culminar em infecções oportunistas e sepse, resultando na interrupção do tratamento e em uma alta taxa de mortalidade (Montassier et al., 2015; Fijlstra et al., 2015). Apesar da sua gravidade, há poucos mecanismos de intervenção na mucosite propostos (Ribeiro et al., 2016).

Os metabólitos de TRP desempenham um importante papel no controle de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal e de barreiras epiteliais, por atenuarem a inflamação e o estresse oxidativo, promoverem a integridade da barreira intestinal e a resistência contra infecções (Zelante et al., 2013; Scott et al., 2020; Shen J et al., 2022). Alguns desses metabólitos exercem seu efeito protetor via ativação de AHR (Islam et al., 2017; Ehrlich et al., 2020). O AHR é um fator de transcrição dependente de ligante, expresso em células intestinais, hepáticas e sanguíneas (Wada et al., 2016; Metidji et al., 2018). Esse receptor exerce tanto um papel antimicrobiano, por meio da transcrição de Interleucina 22 (IL22), que também contribui para a integridade do epitélio intestinal (Monteleone et al., 2011; Julliard et al., 2014), quanto anti-inflamatório, pela síntese de Interleucina 10 (IL10) (Alexeev et al., 2018).

A ativação de AHR induz a expressão de SOCS2, que é uma proteína associada à supressão da resposta inflamatória exacerbada. Alguns estudos mostram o papel de SOCS2 no controle de doenças inflamatórias, como esteatohepatite e colite, por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias (Al-Araimi et al., 2020; Li S et al., 2021). Nesse contexto, observa-se um crescente interesse em se estabelecer a importância fisiológica dos metabólitos do TRP sobre o epitélio do intestino, bem como sua função na ativação basal de AHR. Assim, hipotetizamos que a ativação de AHR por metabólitos de TRP e consequente indução de SOCS2 tenha papel protetor durante a quimioterapia, sugerindo que essa via possa representar um potencial alvo terapêutico para intervenção durante a mucosite intestinal induzida por quimioterapia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microbiota, disbiose e mucosite intestinal induzida por 5-FU

As superfícies mucosas expostas, como boca e intestino, são colonizadas por um conjunto de microrganismos, denominado microbiota. A microbiota é constituída principalmente por bactérias, mas também estão presentes fungos, vírus, protozoários e archaeas (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 extra-uterino (Fagundes et al., 2011). A composição da microbiota é influenciada por diversos fatores. Eles podem estar associados ao hospedeiro (genética, idade, sexo e sistema imune) ou ao ambiente (dieta e uso de medicamentos, como antimicrobianos e quimioterápicos) (Cani e Knauf, 2016; Hamouda et al., 2017).

Apesar das diferenças interindividuais e da variação da microbiota ao longo do intestino, a microbiota do intestino grosso é composta predominantemente por bactérias anaeróbias obrigatórias, que pertencem, principalmente, a cinco filos: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobactérias, Actinobactérias e Verrucomicrobiota (Donaldson et al., 2016; Rooks e Garrett, 2016; Zuo e Ng, 2018) (Figura 1). Dentre eles, o filo Firmicutes é o mais abundante e diverso no intestino. Esse filo é composto por bactérias Gram-positivo, incluindo o gênero *Lactobacillus*, predominante em camundongos, que desempenha um importante papel na homeostase intestinal (Sougiannis et al., 2019). As Proteobacterias são constituídas por bactérias Gram-negativo, incluindo a família *Enterobacteriaceae*, cuja proporção pode sofrer expansão durante as doenças inflamatórias intestinais (Winter e Bäumler, 2014; Vrakas et al., 2017; Zuo e Ng, 2018; Menezes-Garcia et al., 2020).

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 HL et al., 2017). A integridade do epitélio intestinal depende de um conjunto de elementos relacionados à microbiota, como estímulo à síntese de proteínas antimicrobianas (Proteína de regeneração derivada de ilhotas gama 3 - REGIIIγ), secreção de Imunoglobulina A (IgA) e produção de muco (Molloy, 2013; Ramanan e Cadwell, 2016) (Figura 2). 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 T auxiliares efectoras, como do tipo 17 (Th17) e células T reguladoras (Treg) (Mortha et al., 2014; Lin e Zhang, 2017). A microbiota também pode modular a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), para atenuar a inflamação intestinal (Zuo e Ng, 2018). A função de barreira

também está associada a proteínas que compõem o complexo juncional, constituído pelas zonas de oclusão, junções aderentes e pelos desmossomos, que modulam a permeabilidade intestinal. As zonas de oclusão incluem Zona-occludinas (ZO-1), Ocludina e Claudinas, que regulam a permeabilidade paracelular (Stolfi et al., 2022). As proteínas ZO-1 ligam a Ocludina e as Claudinas às fibras de actina e miosina do citoesqueleto. A Ocludina tem função estrutural e as Claudinas modulam o transporte paracelular (Chelakkot et al., 2018). A família das Claudinas é composta por diversas isoformas, que apresentam funções diferentes, conforme a localização dessas proteínas ao longo do intestino. A Claudina-3, por exemplo, está associada à função de barreira e corresponde a uma das Claudinas mais expressas no intestino, sendo encontradas nas células epiteliais intestinais e no cólon (Garcia-Hernandez et al., 2017). A microbiota também é essencial para o estabelecimento fisiológico da função de barreira. Camundongos isentos de germes (GF) apresentaram menor permeabilidade paracelular e maior expressão das proteínas Claudina-1 e Ocludina em relação aos animais convencionais (Hayes et al., 2018).

A habilidade do sistema imune em diferenciar os microrganismos indígenas daqueles 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).

Perturbações da microbiota, denominado disbiose, compreende a alteração tanto da composição taxonômica quanto da capacidade metabólica da microbiota (Montassier et al., 2015). Uma vez que a microbiota eubiótica desempenha funções no organismo como um todo, a disbiose pode contribuir para o desenvolvimento de doenças tanto locais quanto sistêmicas. Alguns exemplos incluem as IBD, a síndrome metabólica, a esclerose múltipla, a depressão e a mucosite gastrointestinal (Li HL et al., 2017), sendo esta última frequentemente observada durante a quimioterapia de pacientes com tumores sólidos (Singh et al., 2018).

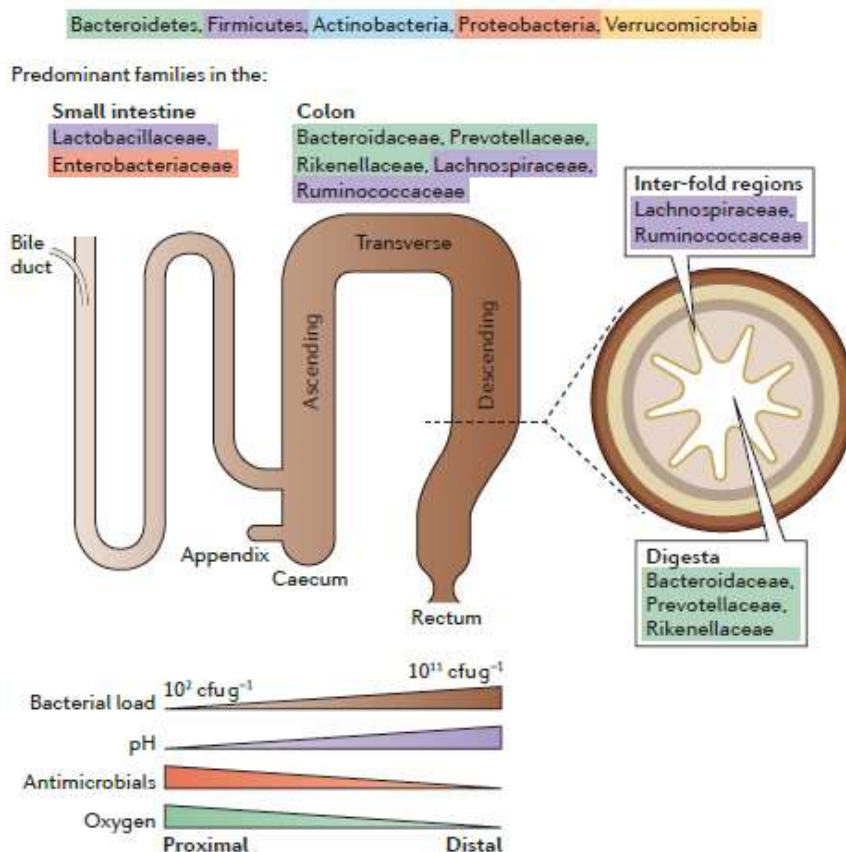


Figura 1- Composição da microbiota ao longo do intestino. A densidade e composição da microbiota intestinal variam do intestino delgado ao cólon conforme os gradientes de pH, oxigênio e peptídeos antimicrobianos. O intestino delgado é colonizado, principalmente, por bactérias pertencentes às famílias Lactobacillaceae e Enterobacteriaceae, enquanto no cólon predominam as famílias Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae, Lachnospiraceae e Ruminococcaceae. A microbiota do lúmen intestinal é também diferente daquela aderida ao epitélio intestinal, com as famílias Bacteroidaceae, Prevotellaceae, Rikenellaceae predominando no lúmen e as famílias Lachnospiraceae e Ruminococcaceae sendo mais abundantes entre as vilosidades intestinais. Fonte: (Donaldson et al., 2016).

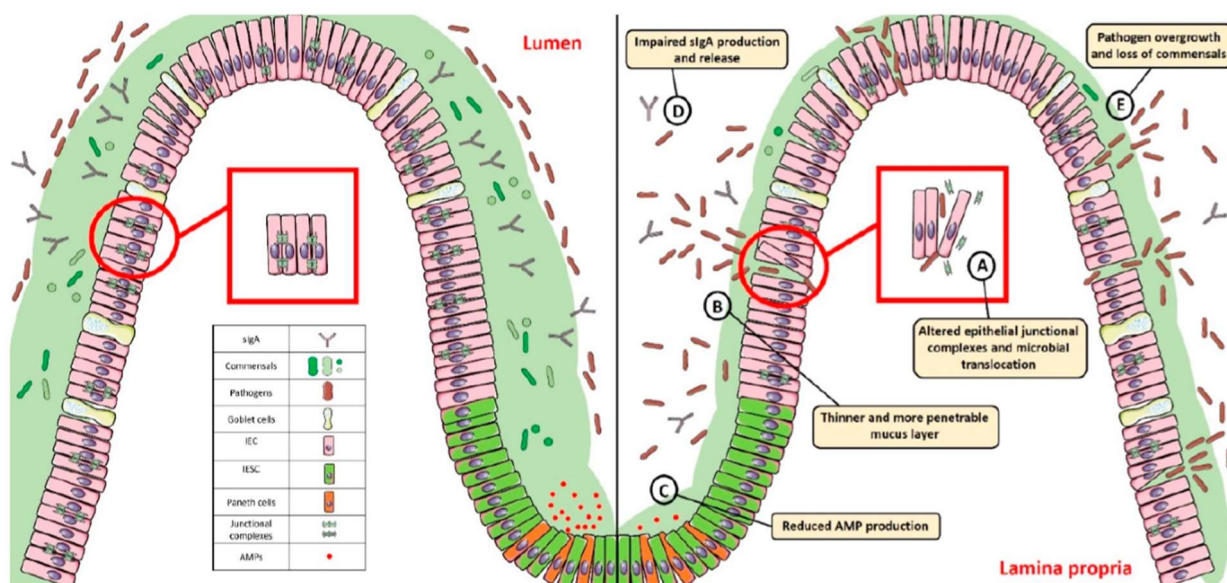


Figura 2- Função de barreira intestinal, microbiota e disbiose. A microbiota intestinal contribui para a manutenção da integridade do epitélio, a qual é fundamental para a homeostase do intestino. O comprometimento

dessa barreira mucosa como: (A) alterações dos complexos juncionais epiteliais; (B) alteração da espessura da camada de muco; (C,D) redução na síntese de peptídeos antimicrobianos e de IgA; (E) expansão do conteúdo de patógenos, os quais podem atravessar a barreira epitelial; pode levar à disbiose e perturbação da homeostase intestinal. Fonte: (Stolfi et al., 2022).

O quimioterápico 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), 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, o que bloqueia a síntese de DNA (Figura 3) (Batista et al., 2020). A etapa limitante desse catabolismo ocorre no fígado, onde mais de 80% do 5-FU administrado sofre biotransformação (Longley et al., 2003; Zhang N et al., 2008; Zhang W et al., 2012; Hamouda et al., 2017). No fígado, o 5-FU é metabolizado pela diidropirimidina desidrogenase, cuja inibição potencializa os efeitos hepatotóxicos (Bahirwani e Reddy, 2014). O catabólito formado, diidrouracil, é então convertido a α -fluoro- β -alanina, amônia, uréia e dióxido de carbono. O 5-FU também é metabolizado nos tecidos onde exerce o efeito antitumoral, quando administrado pela via intravenosa (El-Sayyad et al., 2009). Apesar da sua efetividade, o uso clínico do 5-FU é dose limitante, uma vez que pode causar, frequentemente, alterações hematológicas (leucopenia, neutropenia e trombocitopenia) e mucosite gastrointestinal (Singh et al., 2018). Outros eventos adversos incluem resistência ao quimioterápico (Zhang N et al., 2008) e toxicidade cardíaca (Focaccetti et al., 2015) e hepática (El-Sayyad et al., 2009).

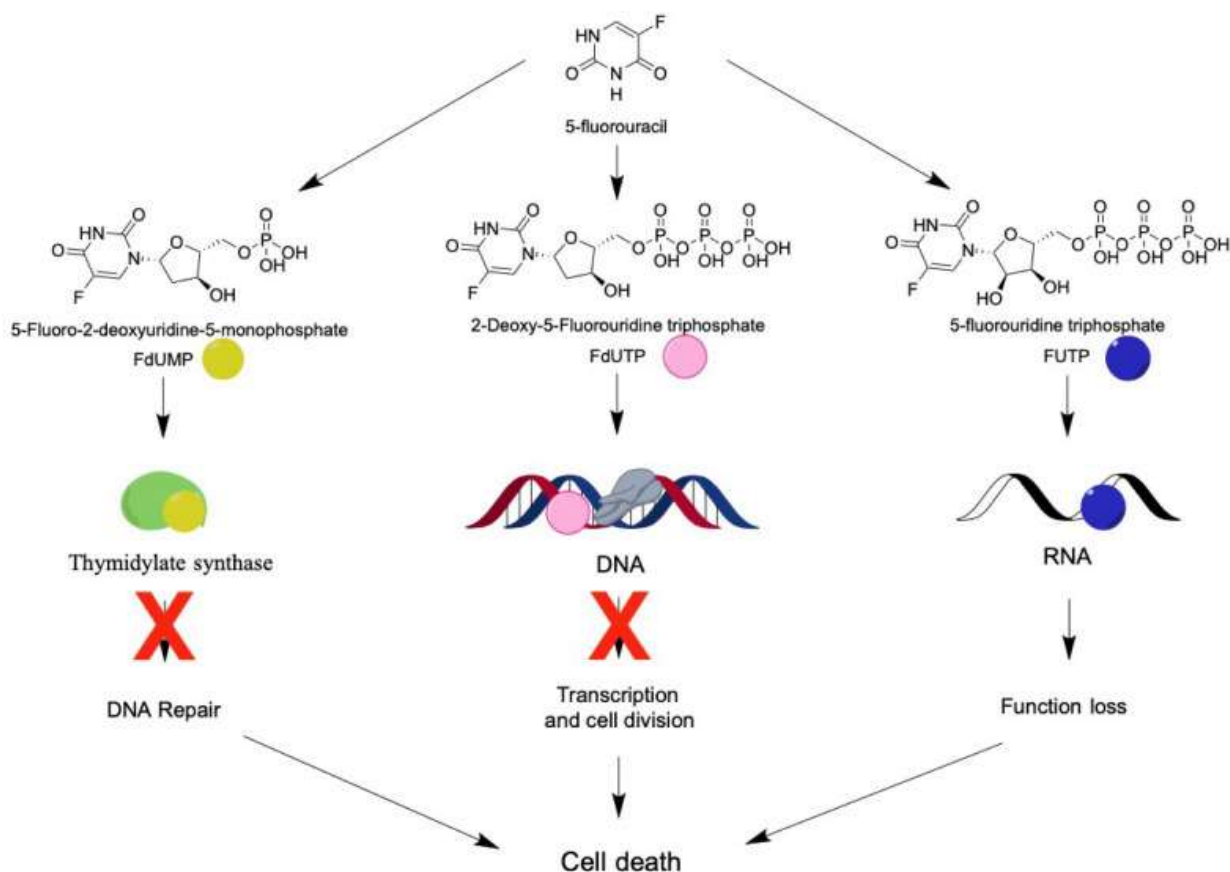


Figura 3- Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil. A molécula do 5-FU é análoga à estrutura das pirimidinas. Os metabólitos ativos do 5-FU podem promover a morte celular por meio dos seguintes mecanismos: inibição da timidilato sintase pelo monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP); comprometimento da síntese de DNA e RNA a partir da incorporação dos metabólitos trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP) aos respectivos ácidos nucleicos. Fonte: (Batista et al., 2020).

A mucosite gastrointestinal é uma das complicações mais frequentes durante a quimioterapia, que afeta em torno de 50-80% dos pacientes. Em geral, a escolha do regime quimioterápico reflete na incidência e gravidade da mucosite (Pedroso et al., 2015; Ribeiro et al., 2016; Vanlancker et al., 2017). A mucosite consiste em lesões na mucosa que podem acometer a cavidade oral, faringe, laringe, o estômago e intestino (Sonis, 2004). Essas lesões são extremamente dolorosas para o paciente e podem provocar diarreia, constipação intestinal, náusea, vômito, desnutrição, perda de peso e infecções graves, o que pode levar à interrupção do tratamento (Ribeiro et al., 2016). 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 ao aumento da inflamação e prejuízo da função de barreira mais acentuada (Pedroso et al., 2015).

O mecanismo de desenvolvimento da mucosite é complexo e dinâmico. No entanto, a fisiopatologia da mucosite pode ser arbitrariamente dividida em cinco fases: iniciação; ativação da sinalização e resposta ao dano primário; amplificação das vias biológicas; inflamação e ulceração do tecido; e cicatrização (Figura 4) (Sonis, 2009; Batista et al., 2020). Inicialmente, os quimioterápicos induzem danos diretos ao DNA de células proliferativas com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Isso gera uma resposta primária ao dano, caracterizada pela ativação de fatores de sinalização como o NF- κ B, que estimula a liberação de mediadores pró-inflamatórios - fator de necrose tumoral (TNF), interleucina1 β (IL1 β), interleucina-6 (IL6), interleucina18 (IL18) e interleucina33 (IL33). A produção de outras citocinas é então estimulada, como a quimiocina ligante com motivo C-X-C 1 (CXCL1), promovendo o recrutamento de neutrófilos, que amplificam a geração de ROS e o consequente dano intestinal (Ribeiro et al., 2016). Além disso, após administração dos quimioterápicos pode ocorrer a redução na expressão de ocludina (proteína relevante para a manutenção das zonas de oclusão e, consequentemente, da integridade de barreira intestinal) e de fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (fator de transcrição associado à indução de antioxidantes e proteínas apoptóticas) no intestino delgado (Yan et al., 2020). A amplificação progressiva do dano ao tecido leva à ruptura da barreira epitelial e subsequente translocação bacteriana. Em um estudo recente demonstrou-se que a disbiose foi secundária à apoptose das criptas epiteliais e à inflamação (Segers et al., 2021). Além disso, o dano direto ao DNA microbiano causado pelo quimioterápico gera padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs também levam a ativação do NF- κ B, via receptores do tipo Toll (TLR) - fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), que resulta na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL18 e IL33), amplificando o dano intestinal (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 (Sonis, 2009; Vasconcelos et al., 2016; Hamouda et al., 2017). Assim, o desenvolvimento da mucosite está intimamente relacionado à citotoxicidade direta do quimioterápico e morte celular, à inflamação e à microbiota intestinal (Hamouda et al., 2017).

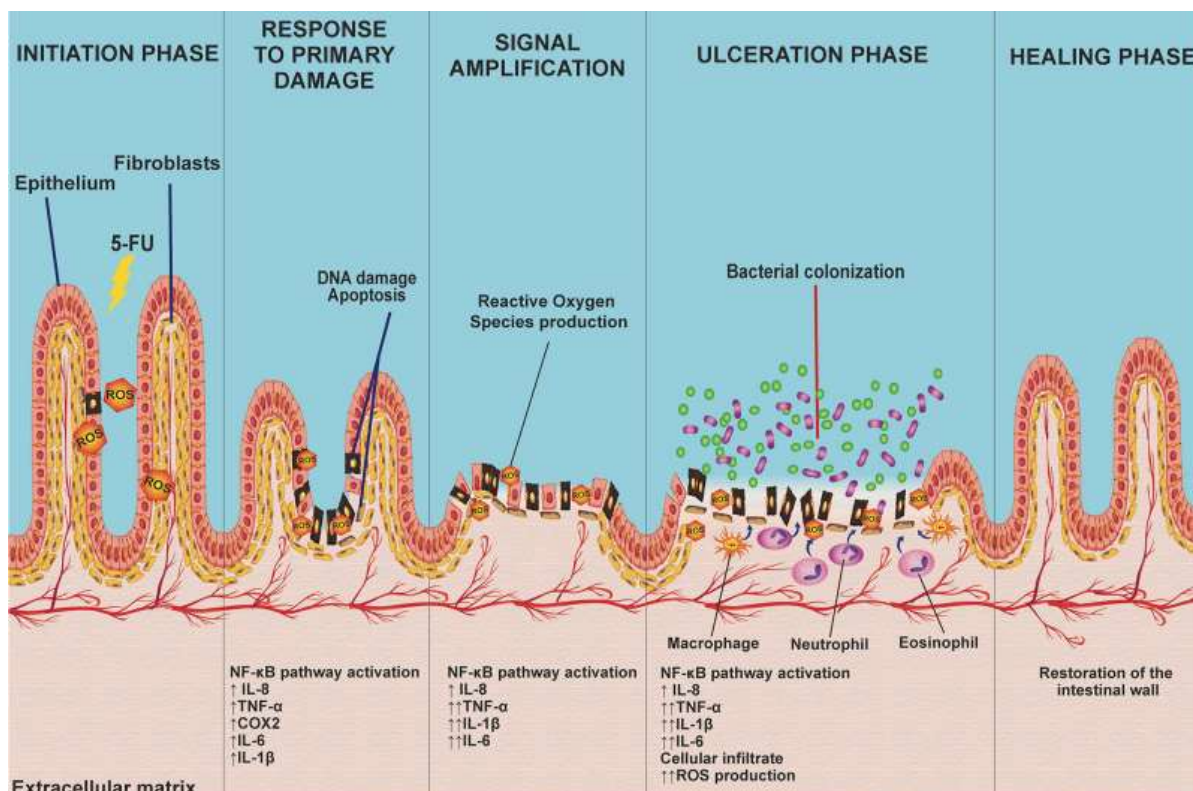


Figura 4- Fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil. O desenvolvimento da mucosite intestinal pode ser dividido nas seguintes fases: 1) iniciação (dano direto ao DNA da célula provocado pelo 5-FU, com produção de ROS); 2) resposta ao dano primário (ativação da via de NF-κB e liberação de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas); 3) amplificação do sinal (aumento da geração de ROS e da produção de mediadores inflamatórios); 4) ulceração (ruptura da barreira epitelial e translocação bacteriana, com manutenção da produção dos fatores citados anteriormente) e 5) cicatrização (restauração do epitélio intestinal após a interrupção do tratamento com quimioterápico). Fonte: (Batista et al., 2020).

O desenvolvimento da resposta inflamatória depende da colonização intestinal pela microbiota, como evidenciado pela ausência de inflamação em animais GF, que é revertida após a recomposição da microbiota (Souza et al., 2004; Souza et al., 2007; Fagundes et al., 2012). No modelo murino de mucosite intestinal induzida por quimioterapia, a ausência de microbiota resulta em aumento da resistência à doença (Brandi et al., 2006; Pedroso et al., 2015; Menezes-Garcia et al., 2020). Camundongos GF mostraram proteção contra lesão intestinal e inflamação após a administração de 5-FU ou irinotecano (Pedroso et al., 2015; Menezes-Garcia et al., 2020). Tanto em camundongos GF quanto em camundongos tratados com antimicrobianos, o quimioterápico doxorrubicina não promoveu o recrutamento de macrófagos e neutrófilos. A depleção da microbiota com antimicrobianos também mostrou redução nas quimiocinas imunomoduladoras, que recrutam macrófagos e neutrófilos, bem como no dano intestinal (Carr et al., 2017). O fenótipo protetor contra mucosite observado em camundongos GF foi revertido após a reposição da microbiota (Pedroso et al., 2015; Menezes-Garcia et al., 2020). Mais especificamente, a monocolonização com *Escherichia coli* (*E. coli*) nesses animais foi

suficiente para promover inflamação e dano tecidual induzido pela quimioterapia (Menezes-Garcia et al., 2020). Esses efeitos foram observados em animais convencionais, nos quais a expansão de enterobactérias, incluindo *E. coli*, foi associada à exacerbação da mucosite intestinal induzida por quimioterapia (Menezes-Garcia et al., 2020; Wang D et al., 2021). A monocolonização com *E. coli* foi capaz de modular a liberação de mediadores anti-inflamatórios, por meio da redução dos níveis de corticosterona em animais GF, o que resultou no agravamento da mucosite (Menezes-Garcia et al., 2020). Na ausência de microbiota, níveis mais elevados de corticosterona plasmática podem estimular a síntese de moléculas anti-inflamatórias como IL10 (Souza et al., 2007; Fagundes et al., 2012; Pedroso et al., 2015; Menezes-Garcia et al., 2020) e anexina-1 (Souza et al., 2007; Menezes-Garcia et al., 2020), evitando o desenvolvimento de mucosite (Menezes-Garcia et al., 2020). Outros estudos também mostram que o controle da microbiota por meio do uso de antimicrobianos ou probióticos resulta na atenuação da lesão e da inflamação. Em conjunto, esses achados demonstram a importância da microbiota na patogênese da mucosite induzida por quimioterapia (Pedroso et al., 2015; Hamouda et al., 2017).

Diferentes táxons microbianos podem contribuir para o desenvolvimento e/ou agravamento da mucosite intestinal. A redução do conteúdo de *Enterobacteriaceae*, após a administração de ciprofloxacino em camundongos, promoveu uma diminuição do dano intestinal e da inflamação durante a mucosite intestinal induzida por 5-FU (Menezes-Garcia et al., 2020). O aumento do conteúdo de *Prevotella copri*, pertencente ao filo Bacteroidota, foi associado à maior gravidade da mucosite intestinal induzida por carboplatina em camundongos. A prevenção da expansão do *Prevotella copri* após o pré-tratamento com metronidazol resultou em diminuição da lesão da mucosa intestinal e da inflamação (Yu et al., 2019). O metronidazol é indicado para a prevenção e tratamento de infecções por anaeróbios, como *Clostridium* sp e *Bacteroides* sp (ANVISA, 2021). Outras bactérias estão associadas ao desenvolvimento de IBD, como *Clostridioides difficile*, que é sensível à vancomicina (Kim et al., 2013; Hasegawa et al., 2014). Bactérias sensíveis à ampicilina, como os lactobacilos, são potenciais produtores do metabólito de TRP Iald, cuja administração atenuou a colite em camundongos (Zelante et al., 2013).

A disbiose pode contribuir para o agravamento da mucosite intestinal, por meio do comprometimento da modulação da resposta inflamatória, da imunorregulação, da permeabilidade intestinal e do estresse oxidativo. Além disso, a disbiose interfere na composição da camada de muco, resistência a estímulos nocivos e reparo epitelial (Fijlstra et

al., 2015). Um estudo *in vitro* demonstrou que os quimioterápicos exercem uma alteração direta mínima na microbiota intestinal, sendo fundamental a interação microbiota-hospedeiro na indução ou agravamento da disbiose (Vanlancker et al., 2017). A mucosite intestinal induzida por 5-FU pode promover diminuição da riqueza e da diversidade da microbiota intestinal (Li HL et al., 2017). Dentre as alterações observadas estão a redução na abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidota (Sougiannis et al., 2019) e a expansão do conteúdo de bactérias do filo Proteobacteria, como as enterobactérias (Menezes-Garcia et al., 2020). A redução do filo Bacteroidota e a expansão de enterobactérias estão associadas ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da lesão intestinal (Hamouda et al., 2017; Sougiannis et al., 2019; Menezes-Garcia et al., 2020). Alguns membros do filo Bacteroidota sintetizam ácidos graxos de cadeia curta (SCFA), como butirato, que contribuem para manter a integridade do epitélio intestinal. Assim, a diminuição da abundância de Bacteroidota, após o tratamento de camundongos com 5-FU, comprometeu a função de barreira epitelial, favorecendo a mucosite intestinal (Chen H et al., 2020). Sugere-se que a disbiose leva à lesão da mucosa intestinal por meio do aumento da expressão de TLR, que induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da permeabilidade intestinal (Tang et al., 2017).

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

2.2 Metabolismo de Triptofano e microbiota intestinal

A microbiota sintetiza diversos metabólitos que atuam como moléculas sinalizadoras capazes de alterar a expressão gênica nos tecidos do hospedeiro (Schroeder e Bäckhed, 2016), como nutrientes, seja atuando como fonte energética ou como vitaminas, e como mediadores imunes (Blacher et al., 2017). Os metabólitos de TRP têm demonstrado um importante papel na proteção contra IBD e na resistência contra a colonização de patógenos (Shimada et al., 2013; Zelante et al., 2013). O TRP é um aminoácido essencial proveniente do catabolismo de proteínas da dieta, que pode ser metabolizado por três principais vias: via da serotonina, via das quinureninas (KYN) e via dos indóis (Figura 5) (Agus et al., 2018), sendo destacadas essas duas últimas vias no presente trabalho.

O TRP pode ser metabolizado pelas enzimas do hospedeiro, sendo que a via das KYN é mais comumente ativa no trato gastrointestinal. A principal enzima que converte o TRP em KYN é a IDO1, a qual está envolvida na supressão da inflamação e no desenvolvimento de células Treg (Zelante et al., 2013). A expressão de IDO1 é influenciada pela microbiota intestinal, o que foi evidenciado em experimentos com animais GF. Demonstrou-se também que os lactobacilos podem induzir a síntese de KYN, via modulação de IDO1 nas células epiteliais do intestino (Korecka et al., 2016; Qi et al., 2019). Além disso, bactérias comensais podem sintetizar KYN via IDO1 (Vujkovic-Cvijin et al., 2013; Fagarasan et al., 2002).

Por outro lado, o TRP também pode ser metabolizado diretamente pela microbiota intestinal e gerar diversos produtos, capazes de desempenhar funções anti-inflamatórias e antioxidantes ou citotóxicas (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 microbianos de TRP, destaca-se o Iald, que pode ser sintetizado por *Limosilactobacillus 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). Por exemplo, o metabolismo do TRP é significativamente alterado durante a colite, em que se observa uma redução dos níveis séricos de indol, indol-3-ácido propionico (IPA) e Iald em modelo animal e em pacientes (Alexeev et al., 2018). Em pacientes com IBD, também ocorre uma redução significativa dos níveis séricos de TRP e um aumento de KYN, acompanhado da maior atividade de IDO1 (Nikolaus et al., 2017).

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

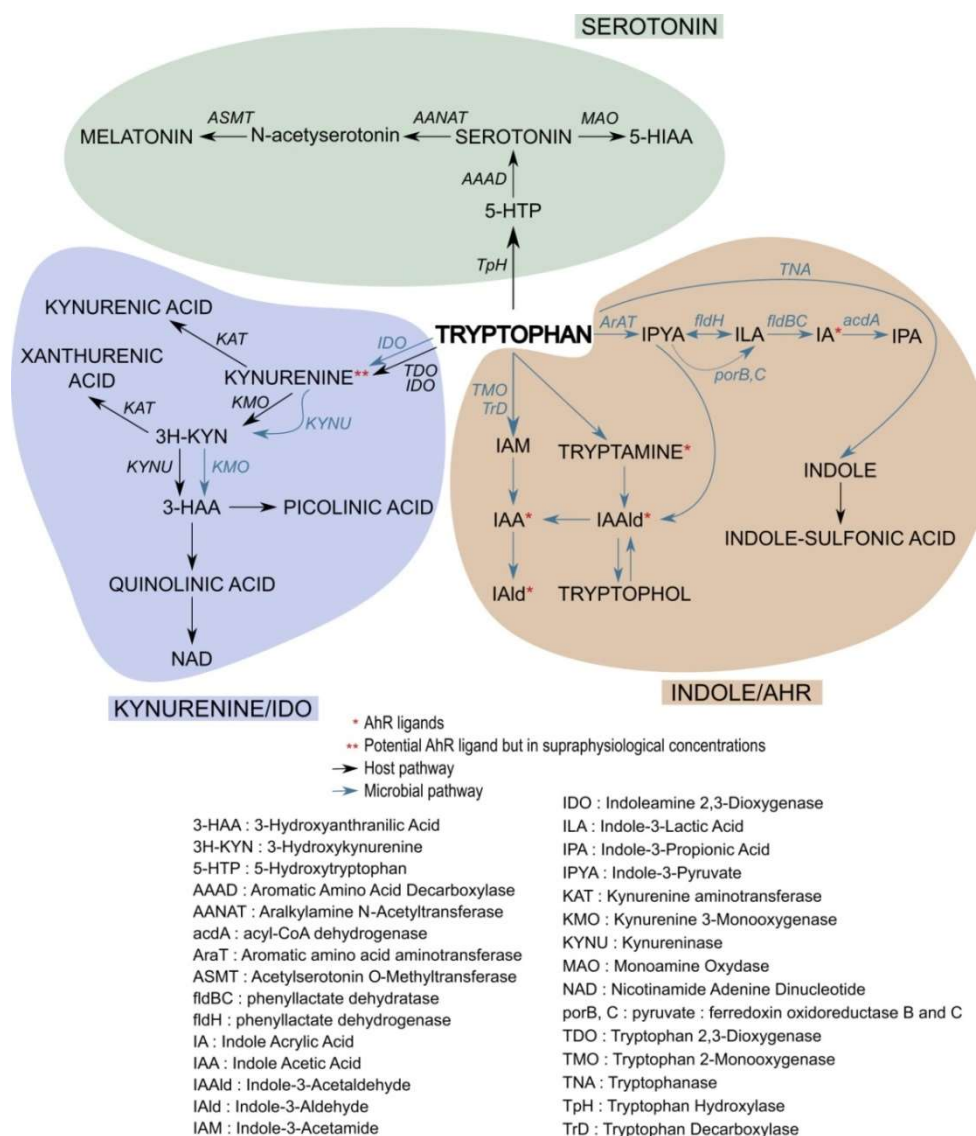


Figura 5- Vias do metabolismo de triptofano. O TRP proveniente do catabolismo de proteínas da dieta é convertido a diversos metabólitos pelas vias do hospedeiro (via da serotonina e via das KYN) e por meio do metabolismo microbiano (via dos indóis). Alguns desses metabólitos, como o Iald e as KYN, são ligantes de AHR. As KYN são sintetizadas a partir da enzima IDO1, que pode estar presente tanto no hospedeiro quanto em componentes da microbiota. Fonte: (Agus et al., 2018).

2.3 Metabolismo de Triptofano e AHR

Diversos metabólitos de TRP, sintetizados pela microbiota ou pelo hospedeiro, constituem ligantes de AHR e desempenham funções essenciais para a manutenção da homeostase intestinal (Agus et al., 2018). O AHR é um fator de transcrição dependente de ligante, intensamente 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 podem ser de origem exógena, que incluem xenobióticos, como a dioxina (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina), ou endógena, que envolve os ligantes derivados de componentes da dieta e do metabolismo de TRP, além de eicosanoides, como a lipoxina A4. Estudos recentes também identificaram o butirato como potencial ligante de AHR nas células epiteliais intestinais (IECs) (Marinelli et al., 2019). A estrutura do AHR contém um domínio predito como de ligação ao ligante, 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 é translocado 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 promove o início da transcrição de genes (Figura 6), incluindo aqueles que codificam as enzimas do citocromo P450, como aquelas pertencentes à família 1, subfamília A e polipeptídeo 1 ou 2 (CYP1A1 e CYP1A2), envolvidas 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 (IL6, IL22) e a angiogênese (Hubbard et al., 2015).

A sinalização de AHR é dependente da microbiota. Metabólitos microbianos podem regular a expressão e atividade de AHR, o que foi demonstrado após a administração de butirato em camundongos GF (Korecka et al., 2016). Ligantes de AHR provenientes da dieta, por sua vez, modulam a microbiota intestinal (Korecka et al., 2016; Brawner et al., 2019; Schanz et al., 2020). A suplementação de uma dieta pobre em ligantes de AHR com indol-3-carbinol (I3C) reverteu a alteração da composição e diversidade da microbiota intestinal. No entanto, esses efeitos ocorreram de forma tanto dependente quanto independente de AHR. (Schanz et al., 2020). A microbiota disbiótica resultante de uma dieta deficiente em ligantes de AHR promove uma redução dos níveis de IgA, o que contribui para o desenvolvimento de colite (Brawner et al., 2019). Por outro lado, agonistas sintéticos de AHR protegeram contra a colite em modelo murino, revertendo a inflamação (Biagioli et al., 2019) e atenuando a lesão intestinal, mediada pela síntese de IL22 dependente de AHR (Chen J et al., 2020).

A ativação de AHR por metabólitos de TRP promove diversos efeitos benéficos no sistema imune e em células não hematopoiéticas (Figura 6). 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 IL22. Além de promover a homeostase das células epiteliais, a IL22 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 IL22 pelas células linfoides 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). Além disso, a produção de IL22 promovida pelo Iald via ativação de AHR estimula a expressão de IL18, o que resulta no controle da inflamação na candidíase vulvovaginal (Borghi et al., 2019). A função de barreira epitelial também pode ser promovida por mecanismo independente da liberação de IL22, a partir da ativação direta de células epiteliais intestinais. Metabólitos de TRP derivados da microbiota promovem o aumento da integridade do epitélio intestinal, via ativação de AHR e modulação do complexo juncional apical (zonas de oclusão e junções aderentes), por meio da inibição de proteínas reguladoras de actina (Scott et al., 2020). Além disso, o ácido indol-3-láctico (ILA) ou ácido indol-3-acético (IAA) também alteram o conteúdo da microbiota intestinal, atenuam a inflamação e o estresse oxidativo celular, via ativação de AHR (Ehrlich et al., 2020; Shen J et al., 2022). Nas IECs, o AHR também modula a diferenciação de células-tronco, que juntamente com a regulação de citocinas pró-inflamatórias, previne contra a tumorigênese colorretal (Díaz-Díaz et al., 2016; Metidji et al., 2018).

Estudo recente revelou que a expressão da proteína IDO1 pode ser induzida por citocinas inflamatórias, como a IL6, o que acelera a conversão do TRP em KYN. O aumento da concentração de KYN no cólon de ratos tratados com irinotecano contribuiu para o reparo da lesão tecidual, via ativação de AHR. Ainda, a administração de um agonista de AHR melhorou os parâmetros clínicos e reduziu a lesão intestinal e a inflamação induzidas pelo quimioterápico (Wang D et al., 2020). Assim, a deficiência na sinalização de AHR devido à alteração do metabolismo de TRP aumenta a susceptibilidade a diversas doenças, como síndrome metabólica (Natividad et al., 2018), tumores no cólon (Díaz-Díaz et al., 2016), IBD (Zelante et al., 2013), lesão intestinal induzida por quimioterápico (Wang D et al., 2021) e aumenta a gravidade da lesão hepática induzida por álcool (Wrzosek et al., 2021).

Além das vias citadas anteriormente, AHR induz a expressão de SOCS2, que é uma das oito proteínas da família SOCS (SOCS1-7 e a proteína contendo SH2 induzível por citocina). SOCS desempenha a função de controle da resposta inflamatória exacerbada, por meio de diferentes vias de sinalização, como a inibição de vias Janus quinase/transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK/STAT) (Figura 7) e do NF- κ B (Delgado-Ortega et al., 2013).

O papel de SOCS2 na resposta inflamatória tem sido abordado em diferentes contextos. SOCS2 promoveu o controle da esteato-hepatite não-alcoólica, por meio da inibição da inflamação e da apoptose (Li S et al., 2021). Na colite, camundongos deficientes em SOCS2 apresentaram um agravamento da doença (Al-araimi et al., 2020), porém houve um prejuízo da qualidade óssea após expressão de SOCS2 (regulador negativo do hormônio de crescimento) induzida por citocinas pró-inflamatórias (Dobie et al., 2018).

Estudos recentes têm demonstrado o papel de AHR e/ou de SOCS2 no controle da inflamação (Rothhammer et al., 2016) e na proteção contra lesão hepática (Wada et al., 2016; Monti-Rocha et al., 2019). A expressão de SOCS2 dependente de AHR mostrou inibir a ativação de NF- κ B em astrócitos (Rothhammer et al., 2016). O AHR também exerce um papel hepatoprotetor contra a esteatose induzida por dieta rica em gordura e a consequente inflamação causada pela lipotoxicidade, por meio da expressão de SOCS3 (Wada et al., 2016), que é regulada por SOCS2.

Ainda não há estudos na literatura que demonstrem o perfil dos metabólitos de TRP microbianos, a ativação de AHR e a expressão de SOCS2 durante a mucosite intestinal induzida por quimioterapia. Assim, nossa hipótese é que metabólitos de triptofano protegem da morbidade após a quimioterapia, por promoverem a função de barreira intestinal, via ativação de AHR e indução de SOCS2.

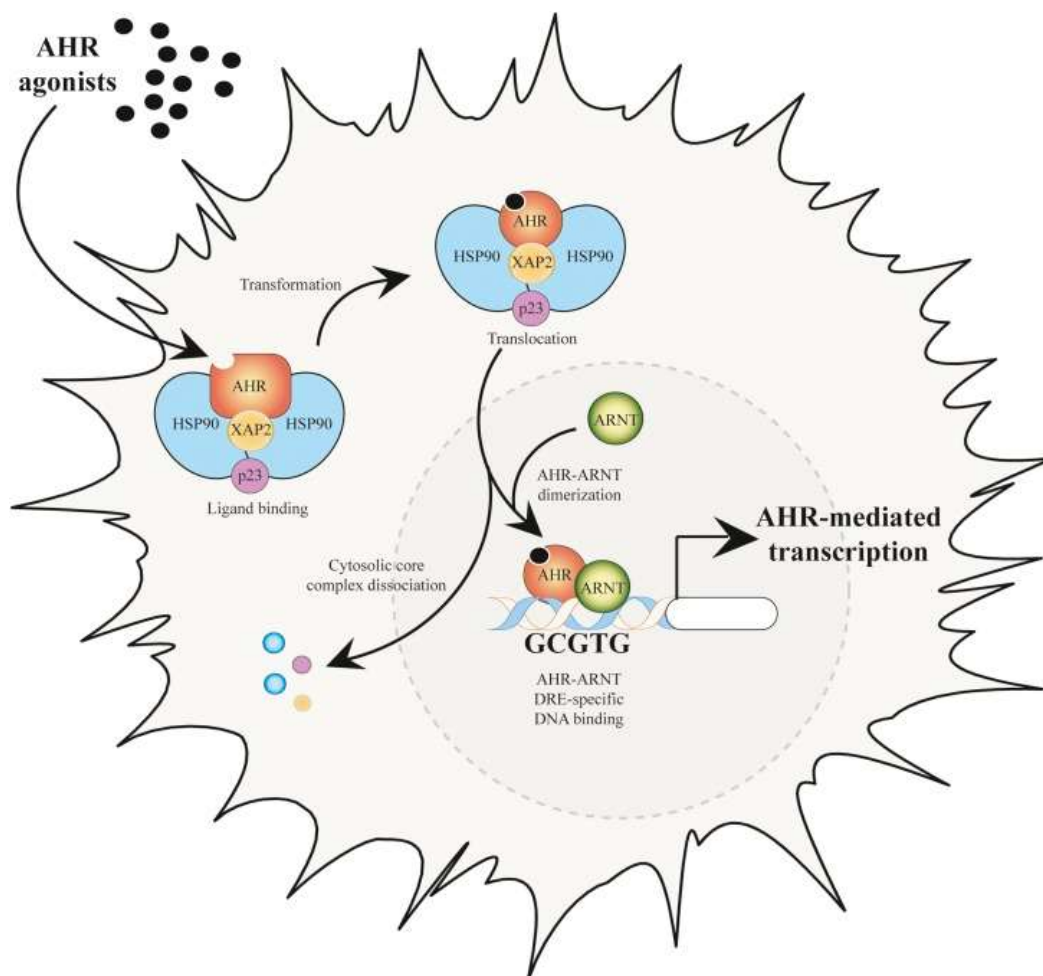


Figura 6- Mecanismo de ativação de AHR mediada por ligante. A estrutura do AHR contém um domínio predito como de ligação ao ligante, que permite o reconhecimento de uma variedade de ligantes pelo receptor. Após a interação com o ligante, o AHR no citosol transloca para o núcleo, onde se associa com o translocador nuclear de AHR (ARNT). O heterodímero AHR/ARNT formado se liga a uma sequência consenso de DNA nas regiões promotoras e favorece o início da transcrição de genes. Fonte: (Hubbard et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Determinar o papel do metabolismo de TRP e da ativação de AHR no controle dos efeitos adversos associados à quimioterapia com 5-FU em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar temporalmente o modelo de mucosite intestinal induzida por quimioterápico, a partir da análise do índice de atividade de doença, de parâmetros inflamatórios, microbiológicos, histológicos e bioquímicos;
- Determinar se e quando há perda de função de barreira na mucosa intestinal após a quimioterapia;
- Avaliar o efeito do tratamento com o antimicrobiano ampicilina na translocação bacteriana e morbidade induzida pela mucosite intestinal;
- Determinar as concentrações de metabólitos de TRP no plasma e no tecido do íleo bem como da atividade de AHR nos tecidos após indução da mucosite intestinal com 5-FU;
- Determinar a susceptibilidade de animais *Ahr*^{-/-} à mucosite intestinal;
- Avaliar o efeito da administração de um agonista de AHR (Iald) nas alterações induzidas pela quimioterapia com 5-FU;
- Determinar o papel IDO1 no metabolismo de TRP e ativação de AHR após a quimioterapia com 5-FU;
- Determinar a susceptibilidade de animais *Ido1*^{-/-} à mucosite intestinal;
- Avaliar o efeito da exposição a ampicilina na translocação bacteriana e morbidade induzida pela mucosite intestinal em animais *Ido1*^{-/-};
- Determinar a susceptibilidade de animais *Socs2*^{-/-} à mucosite intestinal.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Os procedimentos experimentais realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) - protocolos 275/2017 19/2023 e 20/2023. Camundongos C57BL/6, fêmeas

com 8 a 9 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da UFMG e fêmeas de animais repórter para ativação de AHR (*LacZ^{XRE}*), *Ahr*^{-/-}, *Ido1*^{-/-} e *Socs2*^{-/-} foram obtidos do biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde os animais foram mantidos. Os camundongos foram randomizados de forma aleatória, 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

i. Quimioterapia

O protocolo de indução da mucosite intestinal com o quimioterápico 5-FU (Fauldfluor, Libbs, São Paulo, Brasil) consistiu em uma dose de 75 mg/kg administrada durante 3 dias consecutivos, o qual padronizei durante o mestrado (Batista, 2019). Foram administrados 100 (μL) por animal via i.p. O veículo da droga é solução salina tamponada por fosfato (PBS).

ii. Azul de Evans

Foram administrados 400 microlitros (μL) de Azul de Evans (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) (125 mg/mL), diluídos em água filtrada, por gavagem oral, a todos os animais 24 horas antes da eutanásia (Li et al., 2022).

iii. Administração de ampicilina

Animais WT foram tratados com ampicilina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) (1,0 g/L) na água de beber (Fagarasan et al., 2002) a partir do dia inicial da quimioterapia e durante todo o período experimental.

iv. Administração de Iald

Animais WT foram tratados diariamente com Iald (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) (100 mg/kg) 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 μ L da suspensão de Iald em carboximetilcelulose (CMC) 0,5% p/v em água filtrada por animal.

4.3 Protocolo experimental e parâmetros avaliados

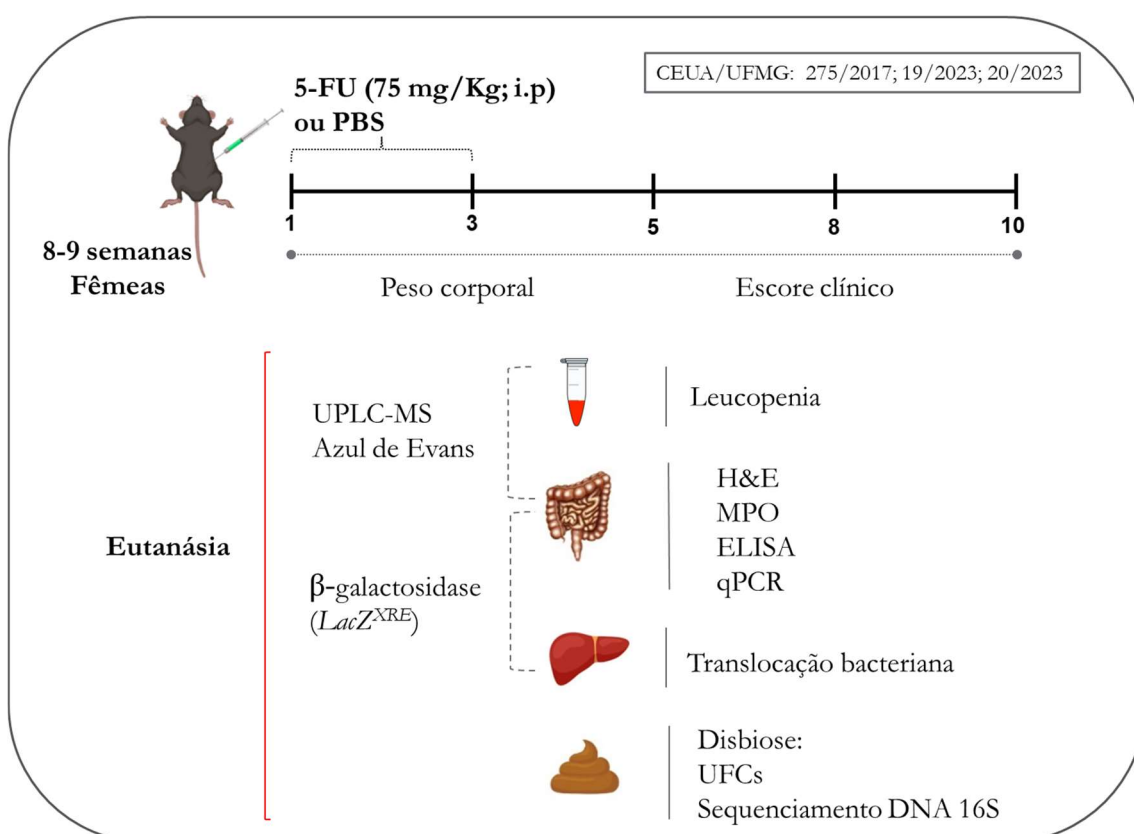


Figura 7- Parâmetros avaliados durante o curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais foram tratados com 5-FU (75 mg/Kg; i.p) ou PBS durante três dias consecutivos para análise do peso corporal, escore clínico ao longo do protocolo experimental. Nos dias determinados, os animais foram eutanasiados para a coleta de sangue, intestino delgado e fígado, além das fezes, para realizar as análises correspondentes, mostradas na figura.

Os animais submetidos à mucosite intestinal por 5-FU foram pesados e as fezes coletadas para a determinação do escore clínico, conforme mostrado na Figura 7, nos tempos indicados no protocolo experimental. Em relação ao peso corporal, quando a perda é superior a 20% os animais são eutanasiados, por questões éticas. No momento da eutanásia, após anestesia geral, foram coletados sangue, íleo e fígado. Para avaliar a leucopenia, indicativa do efeito do quimioterápico, procedeu-se a contagem de leucócitos totais do sangue em câmara de

Neubauer. A lesão tecidual foi avaliada a partir da análise histopatológica de cortes histológicos do íleo, corados com hematoxilina e eosina (H&E) e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), sugestiva de infiltrado neutrofílico, também foi determinada em fragmentos do íleo. A permeabilidade intestinal foi avaliada por meio da determinação da concentração de azul de Evans no plasma e intestino delgado, além da análise da expressão de proteínas de barreira intestinal no tecido do íleo, por Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). A translocação bacteriana para o fígado foi determinada por meio do cultivo de amostras de fígado no meio sólido Muller-Hinton (MH), Bile esculina ou MacConkey. A análise da microbiota intestinal foi realizada a partir do plaqueamento das fezes em ágar Bile esculina, MacConkey ou de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e por meio do sequenciamento do DNA 16S das fezes de animais WT ou *Ido1*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal. Além disso, a concentração de metabólitos de TRP foi avaliada no plasma e no tecido do íleo de animais WT ou *Ido1*^{-/-} tratados com 5-FU. Durante a caracterização da doença, foi determinada a concentração de algumas citocinas inflamatórias no tecido do íleo, por ELISA e a atividade de AHR foi determinada por ensaio colorimétrico de beta-galactosidase em extratos de tecidos de animais LacZ^{XRE} ou pela análise da expressão de *Cyp1a1* e *Socs2*, no íleo.

4.4 Determinação do escore clínico

A análise do escore clínico dos animais foi baseada na consistência fecal e presença de sangue oculto nas fezes, por meio do teste de papel guáiaço (Feca/cult- INLAB, São Paulo, Brasil), além da avaliação da perda percentual de peso corporal e de sinais de morbidade (adaptado de VIEIRA et al., 2009), conforme a figura mostrada 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)				

Figura 8 - Caracterização do escore clínico. Parâmetros avaliados com os respectivos valores de escore atribuído. A soma desses valores corresponde ao escore clínico, que varia de 0 a 11. Fonte: (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 do plexo braquial dos animais, seguida da adição de 90 μ L do corante Turk. As células foram contadas em câmara de Neubauer e visualizadas em microscópio óptico.

4.6 Análise histológica

Amostras do íleo foram removidas e manipuladas de forma adequada, sendo colocadas em cassetes histológicos. 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) e 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 do íleo foi conduzida levando em conta 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. A análise foi feita por um examinador que desconhecia o desenho e os grupos experimentais.

4.7 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 solução 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% p/v e NaCl 1,6% p/v com glicose 5%, p/v 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. Aliquotas 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 ressuspensionado 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 ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, multiskan RC, Uniscience do Brasil) a 450 nm.

4.8 Determinação da concentração de citocinas por ELISA

Amostras de intestino delgado de animais WT foram coletadas para determinação das concentrações das citocinas IL1β, IL23, IL17, IL22, IL10, por ELISA, durante o curso da

mucosite intestinal induzida por 5-FU. As amostras foram diluídas em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, como previamente padronizada em nosso laboratório. Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante e placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), sendo que a sensibilização ocorreu durante 24 horas a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 24 horas. Os poços foram então lavados e o anticorpo de detecção adicionado pelo período de 2 horas. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingen – 1:200) e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50µL de H₂SO₄. A leitura foi realizada no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492 nm.

4.9 Composição da microbiota

i. Determinação de UFCs nas fezes

Amostras de fezes, coletadas no período da manhã, foram diluídas em NaCl 0,9% p/v estéril e cultivadas nos meios sólidos: Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI) (Microgen, Daryaganj, Índia) (não seletivo) ou Bile esculina (Kasvi, Paraná, Brasil) (seletivo para Enterococos ou estreptococos grupo D), MacConkey (Microgen, Daryaganj, Índia) (seletivo para enterobactérias) e MRS (Kasvi, Paraná, Brasil), para análise do número de UFCs de bactérias ácido-láticas. O período de incubação foi de 24 horas em estufa, a 37°C, em aerobiose.

ii. Análises de sequenciamento

a. Processamento das amostras, extração e sequenciamento do DNA:

O DNA fecal foi extraído usando o Kit Quick-DNA Fecal/Soil Microbe 96 Kit (ZymoResearch, Irvine, CA), ou similar com mesmo propósito de extração de DNA fecal. A região V3-V4 da região 16S do gene rRNA foi amplificada por PCR e sequenciada pelo sequenciador MiSeq Illumina, seguindo o protocolo do Earth Microbiome Project com algumas

pequenas modificações, com auxílio do CELAM (Centro de Laboratórios Multiusuários) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG (Verschuren et al., 2018).

b. Processamento e análise dos resultados:

As sequências da região 16S do gene rRNA no formato fastq foram analisadas usando QIIME2 (versão 2021.2) (BOLYEN et al. 2019). As sequências foram demultiplexadas e filtradas por qualidade usando o método Dada2, com os parâmetros padrão do QIIME2, a fim de detectar e corrigir os dados obtidos pelo sequenciamento Illumina, sendo gerada tabela de artefato Qiime 2, tabela OTU ou arquivo BIOM. Após a remoção das quimeras, as OTUs foram mantidas quando representaram mais de 0,005% do número total de sequências (BOKULICH et al., 2013). OTUs então foram classificados usando o banco de dados de referência 16S silva138 (QUAST et al. 2013). Os dados gerados foram carregados pela biblioteca Phyloseq (versão 1.34.0) do R, na qual foram feitas as análises estatísticas e de abundância taxonômica.

4.10 Translocação bacteriana para o fígado

Amostras de fígado foram maceradas e diluídas em NaCl 0,9% p/v estéril. Após a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-4}), as amostras foram cultivadas no meio sólido MH ou BHI para análise do número de UFCs. Amostras de fígado coletadas no oitavo dia após indução da mucosite também foram cultivadas nos meios sólidos Bile esculina, MacConkey e MRS para análise do número de UFCs. O período de incubação foi de 24 horas em estufa a 37°C, em aerobiose, exceto para o meio MRS, que foi incubado durante 48 horas nas mesmas condições.

4.11 Análise da permeabilidade intestinal

i. Azul de Evans

Para a avaliação da permeabilidade intestinal, foram administrados 400 µL de azul de Evans (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) (125 mg/mL), por gavagem oral dos camundongos. Após 24 horas, foram coletados 100 µL de plasma e fragmentos dos tecidos do intestino delgado e fígado (Adaptado de Li et al, 2022). Para a quantificação plasmática do corante, o plasma foi diluído (1:2) e pipetado 50 µL, em duplicata, em placa de fundo reto de 96 poços. A concentração de Azul de Evans foi determinada a 620 nm, utilizando uma curva

padrão, preparada a partir da solução estoque (125 mg/mL). A concentração inicial da curva padrão foi de 20 µg/mL ou 200 µg/mL, para o plasma e intestino, respectivamente, sendo diluídos (1:2) para a obtenção de 7 pontos da curva, além do branco. Os tecidos foram colocados em placas de Petri, previamente pesadas, abertas na estufa a 37°C, durante 24 horas. Em seguida, as placas foram pesadas novamente e adicionou-se 1mL de formamida (Neon, São Paulo, Brasil). Após 24 horas à temperatura ambiente, a concentração de Azul de Evans foi determinada conforme descrito anteriormente, sendo corrigida pelo peso seco de cada um dos fragmentos de tecido.

ii. Análise da expressão dos transcritos de proteínas de barreira intestinal

Foram analisadas a expressão dos genes *Zo-1*, *Ocludina* e *Claudina-3* no tecido do íleo de animais submetidos à mucosite intestinal. 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, Califórnia, EUA) 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 *Gapdh* como controle constitutivo. As amostras foram, então, normalizadas em relação ao gene constitutivo, e foi realizado o cálculo segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a obtenção dos resultados.

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

Zo-1 - Forward: 5' - AGG ACA CCA AAG CAT GTG AG - 3'

Reverse: 5' - GGC ATT CCT GCT GGT TAC A - 3'

Ocludina - Forward: 5' – GAG TTA ACG TCG TGG ACC GGT AT - 3'

Reverse: 5' – CCC TGA AAT ACA AAG GCA GGA ATG - 3'

Claudina-3 - Forward: 5' – CCA ACT GCG TAC AAG ACG AG – 3'

Reverse: 5' – TCT TGG TGG GTG CAT ACT TG – 3'

4.12 Avaliação da atividade de AHR em animais *LacZ^{XRE}*

i. Ensaio de β -galactosidase

Para a avaliação da atividade de AHR foi realizado o ensaio de β -galactosidase (Adaptado de Miller, 1972) em fragmentos do intestino delgado e fígado de animais *LacZ^{XRE}*. Esses animais modificados geneticamente possuem uma inserção do gene *Lacz*, o qual codifica a proteína β -galactosidase, cuja região promotora apresenta três motivos do elemento responsivo a xenobióticos (XRE) de ligação do receptor AHR. O substrato dessa enzima é então hidrolisado, gerando um composto amarelado, cuja absorbância é determinada. Assim, a absorbância é diretamente proporcional à concentração de β -galactosidase presente na amostra e, consequentemente da atividade de AHR.

Para o ensaio, 50 mg do tecido do íleo e fígado foram processados em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125-Fischer Scientific Pennsylvania, USA) com 300 μ L da solução Z buffer (0.06M fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 0.04M fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 0.01M cloreto de potássio (KCl); 0.001M sulfato de magnésio (MgSO_4); 0.05M beta-mercaptoetanol). Após a adição de 100 μ L de clorofórmio e 50 μ L de dodecil sulfato de sódio 0,1%, p/v, as misturas foram vortexadas, centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante coletado para o ensaio. Para iniciar a reação, foi adicionado 0,2 mL do substrato *o*-nitrofenil- β -D-Galactosídeo (ONPG) (4 mg/mL) e, em seguida, os tubos foram vortexados e incubados a 28°C em banho seco. Após o desenvolvimento de cor amarelada, a reação foi parada pela adição de 0,5 mL de 1M

carbonato de sódio (Na_2CO_3). Após centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos, as absorvâncias foram determinadas a 420 e 550 nm, para o cálculo de unidades de atividade, que também incluem os tempos de início e fim da reação.

$$\text{Miller Units} = 1000 \times [(\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550})] / (T \times V)$$

- T = tempo de reação (min).
- V = volume de Z buffer (mL).

4.13 Dosagem de metabólitos de triptofano - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

i. Método analítico

A quantificação de KYN, TRP, I3S, Iald e IAA, adquiridos da empresa Sigma-Aldrich, foi realizada no sistema UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LCTM, Waters, composto por bomba binária, amostrador automático, degasser em linha e detector de arranjos de diodo (DAD) e espectrômetro de massas ACQUITY TQ, Waters, Milford, Massachusetts, EUA, equipado com fonte de ionização por electrospray - Z-spray (ESI) e analisador triplo quadrupolo. Os cromatogramas e espectros foram obtidos e processados online pelo software Mass Lynx™ (versão 4.1, Waters).

As análises foram realizadas em uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, Irlanda; $100 \times 2,1$ mm id, $1,7 \mu\text{m}$) acoplada à pré-coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters; $2,1 \times 5$ mm id, $1,7 \mu\text{m}$), utilizando um sistema de solvente binário composto pela fase móvel de água (A) e acetonitrila (B) acidificados com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. Os gradientes binários foram os seguintes: 5% B por 3 min, 5% a 30% B por 6 min, 30% à 99% B por 6 min, 99% B por 1 min, 99% a 5% B por 1 min e coluna reequilibrada com 5 % B por 3 min. O tempo total foi de 20 min a uma vazão de 0,3mL/min e a temperatura da coluna foi de 40°C. O volume de injeção foi de 5 μL . As condições de ionização por electrospray no modo negativo ESI- e modo positivo ESI+ foram as seguintes: voltagem do capilar, 3,5 Kv; temperatura da fonte, 120°C; temperatura de dessolvatação, 400°C; fluxo do gás nebulizador (N_2), 550 L/h; Fluxo do gás de colisão (Ar), 0,10 mL/ min.

O método analítico desenvolvido utilizou aquisição por Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) com ionização no modo positivo ESI+ para os metabólitos KYN, TRP, Iald e IAA e ionização no modo negativo ESI- para o metabolito I3S. O método foi otimizado em duas transições, específica e confirmatória, com condições espectrométricas específicas para

quantificação de cada metabólito, conforme segue: KYN (m/z 209 $\rightarrow$ 94 Da e 209 $\rightarrow$ 146 Da; voltagem do cone, 20V; energia de colisão, 14/18V); TRP (m/z 205 $\rightarrow$ 146 Da e 205 $\rightarrow$ 118 Da; voltagem do cone, 20V; energia de colisão, 18/26V); I3S (m/z 212 $\rightarrow$ 80 Da e 212 $\rightarrow$ 132 Da; voltagem do cone, 34V; energia de colisão, 22/20V); Iald (m/z 146 $\rightarrow$ 118 Da e 146 $\rightarrow$ 91 Da; voltagem do cone, 25V; energia de colisão, 14/22V); IAA (m/z 176 $\rightarrow$ 130 Da e 176 $\rightarrow$ 103 Da; voltagem do cone, 22V; energia de colisão, 30/30V).

Foi realizada calibração pelo método do padrão externo utilizando os padrões analíticos de referencia KYN, TRP, I3S, Iald, IAA. Foram construídas curvas analíticas a partir de soluções padrões diluídas em 10 % de metanol (10:90 metanol/água) nas seguintes faixas de concentrações pra cada metabolito: KYN: 5 à 1000 ng/mL; TRP: 100 à 10000 ng/mL; I3S: 10 à 1000 ng/mL; Iald: 2,5 à 50 ng/mL; IAA: 5 à 100 ng/mL.

Em seguida as soluções foram filtradas (0,22 μ m), acondicionadas em vials e injetadas em quintuplicata no sistema UPLC-MS/MS. Os dados obtidos foram analisados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados com linearidade estabelecida através do coeficiente de determinação (r^2), sendo $r^2 > 0,999$. Todos os cálculos foram feitos com auxílio dos softwares Masslynx 4.1 e Microsoft Excel 2010. Os resultados de cada metabólito nas amostras foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, em ng/mL (média $\pm$ DP, $n=3$).

ii. Preparo das amostras

A dosagem dos metabólitos de TRP foi realizada em amostras de sangue e tecidos do íleo de animais submetidos à mucosite intestinal por 5-FU. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma armazenado a -80°C , logo após a coleta, assim como as amostras de tecido. Para o ensaio, foram utilizados 120 μ l do plasma, sobre o qual foi adicionado 360 μ l de metanol gelado, para a precipitação de proteínas. As amostras foram então vortexadas e centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Foram coletados 400 μ l do sobrenadante para um tubo contendo 10 mg de resina C18, para a remoção de compostos hidrofóbicos. Após serem vortexadas e centrifugadas, 300 μ l do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, para a remoção do solvente em SpeedVac (Eppendorf Vacufuge plus, Connecticut, USA) durante 2 horas a 45°C . As amostras foram reconstituídas com o mesmo volume de metanol 10% em água miliq. Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtro de seringa (0,22 μ m) para inserts novos, no interior dos vials e, então, foram injetados 5 μ l na coluna, em triplicata.

As amostras de tecido do íleo (50 mg) foram processadas em homogeneizador (Power Gen 125-Fischer Scientific Pennsylvania, USA) com 480 μ l de metanol gelado e procedeu-se

conforme descrito acima. Durante o processamento das amostras, foram preparados dois brancos, sendo metanol gelado que passou pelas mesmas etapas que as amostras e metanol 10% em água miliq.

4.14 Análise da expressão de genes

Para avaliar a ativação de AHR por metabólitos de TRP, foi avaliado a expressão dos genes *Idol*, *Cyp1a1* e *Socs2*, por 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 *Gapdh* como controle constitutivo. As amostras foram, então, normalizadas em relação ao gene constitutivo, e foi realizado o cálculo segundo o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a obtenção dos resultados.

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

Idol - Forward: 5'- TCA AAG CAA TCC CCA CTG TAT CC -3'

Reverse: 5'- TCC ACA AAG TCA CGC ATC CTC -3'

Cyp11a1 – Forward: 5' – CAT CAC AGA CAG CCT CAT TGA GC - 3'

Reverse: 5' – CTC CAC GAG ATA GCA GTT GTG AC - 3'

Socs2 – Forward: 5'- CGG CGG TGG AGG CGA TCT G -3';

Reverse: 5' - CCG AAA TGG TGG CGG AGG GG -3'

4.15 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”, utilizando o pós-teste “Tukey”. Para comparação entre dois grupos, quando necessário, foi utilizado o teste “t de student”. Nos experimentos em que os animais de diferentes grupos foram analisados em tempos distintos, utilizou-se a análise ANOVA “two way” seguida de pós-teste “Tukey”. A taxa de sobrevivência foi analisada pela comparação de curvas de sobrevivência (Log rank). Os resultados foram apresentados como média exceto para as análises de UFCs, nas quais foram utilizadas a mediana. 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

Capítulo I – Quimioterapia com 5-FU induz mucosite intestinal caracterizada por lesão intestinal com alteração de microbiota e perda de função de barreira, culminando em morte de parte dos animais.

1.1 – Caracterização do modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU

Animais submetidos ao tratamento com três doses consecutivas de 5-FU (75 mg/kg) foram acompanhados ao longo de 10 dias, para a caracterização temporal do modelo de mucosite intestinal induzida por quimioterapia, por meio da análise de parâmetros hematológicos, clínicos, histopatológicos, inflamatórios e microbiológicos. Para avaliar a mielossupressão induzida pelo quimioterápico foi realizada a contagem de leucócitos totais, sendo observada uma leucopenia marcante em todos os tempos pós-quimioterapia avaliados (Figura 9A). Os animais apresentaram uma redução do peso corporal de aproximadamente 10% do peso inicial no 5º e 8º dias após indução da doença, com retorno aos níveis basais no 10º dia (Figura 9B). De forma semelhante, houve aumento significativo do escore clínico nos dias 5 e 8 do protocolo experimental. Esse parâmetro compreende a análise das fezes em relação à consistência e presença de sangue oculto, percentual da perda de peso e sinais de morbidade (Figura 9C). Durante esse período, a taxa de sobrevivência dos animais que receberam 5-FU correspondeu a cerca de 50% (Figura 9D).

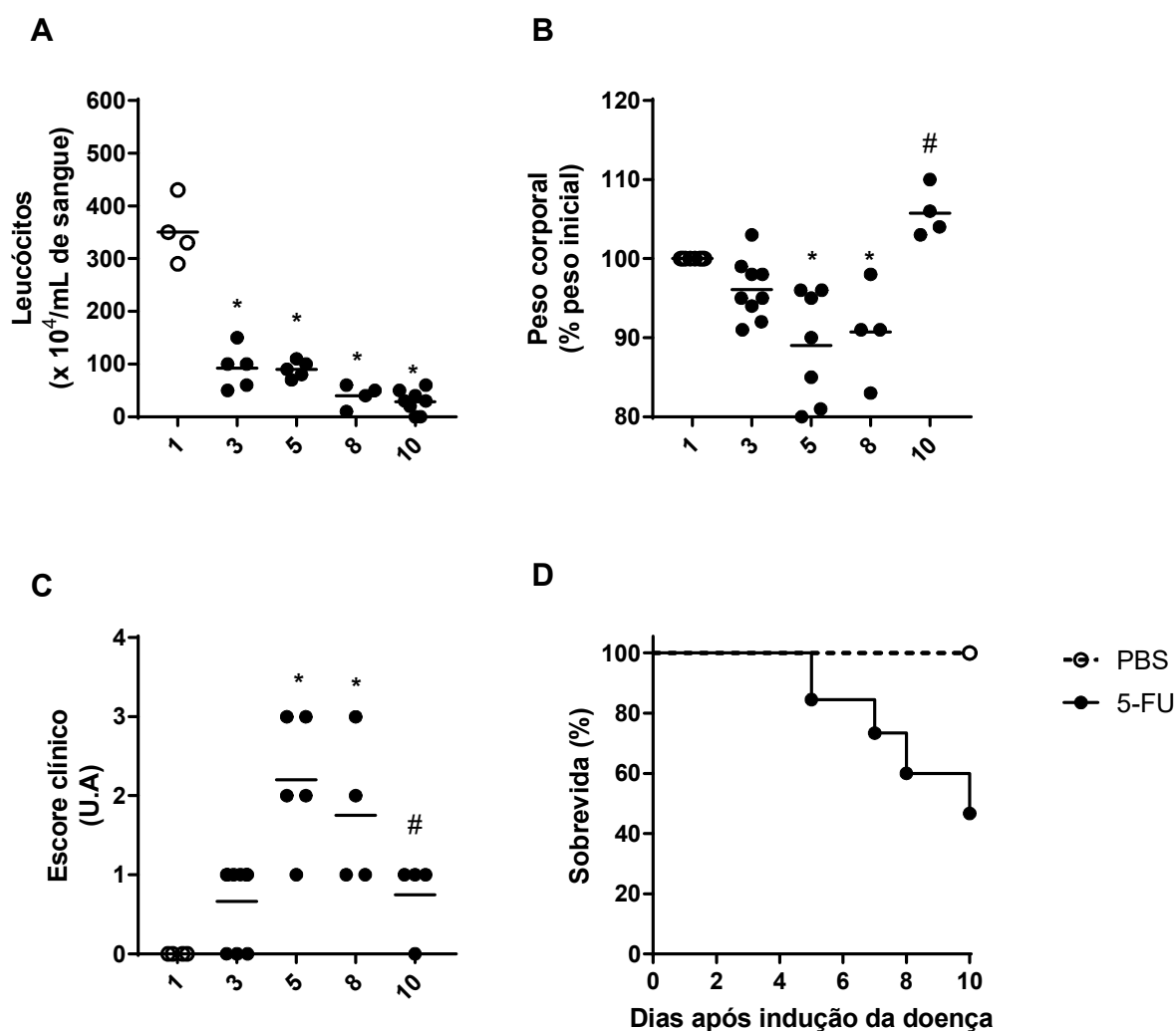


Figura 9- Tratamento com 5-FU leva a alterações hematológicas, clínicas e morte. Animais WT submetidos à mucosite intestinal com 5-FU foram avaliados quanto à leucopenia (A), porcentagem do peso corporal (B), escore clínico (C) e taxa de sobrevivência em relação aos animais tratados com PBS, durante o curso da doença. Os resultados estão expressos em média. $n=4-9$ por grupo. $*p<0,05$ vs. dia 1 e $\#p<0,05$ vs. dia 5. U.A: unidades arbitrárias.

A lesão intestinal induzida pelo quimioterápico foi observada no 5º dia após início do tratamento, sendo caracterizada, principalmente, pela presença de infiltrado inflamatório, alteração da arquitetura das vilosidades e criptas e edema (Figura 10). Consistente com as alterações histológicas, o aumento da atividade de MPO, sugestiva de infiltrado de neutrófilos, também foi detectado no dia 5 do protocolo experimental (Figura 11). Tanto a lesão intestinal quanto a atividade de MPO retrocederam após 10 dias do protocolo experimental (Figuras 10 e 11). Não houve alteração da produção das citocinas pró- ou anti-inflamatórias IL1 β , IL23, IL17, IL22 e IL10, no intestino, no presente modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU (Figura 12).

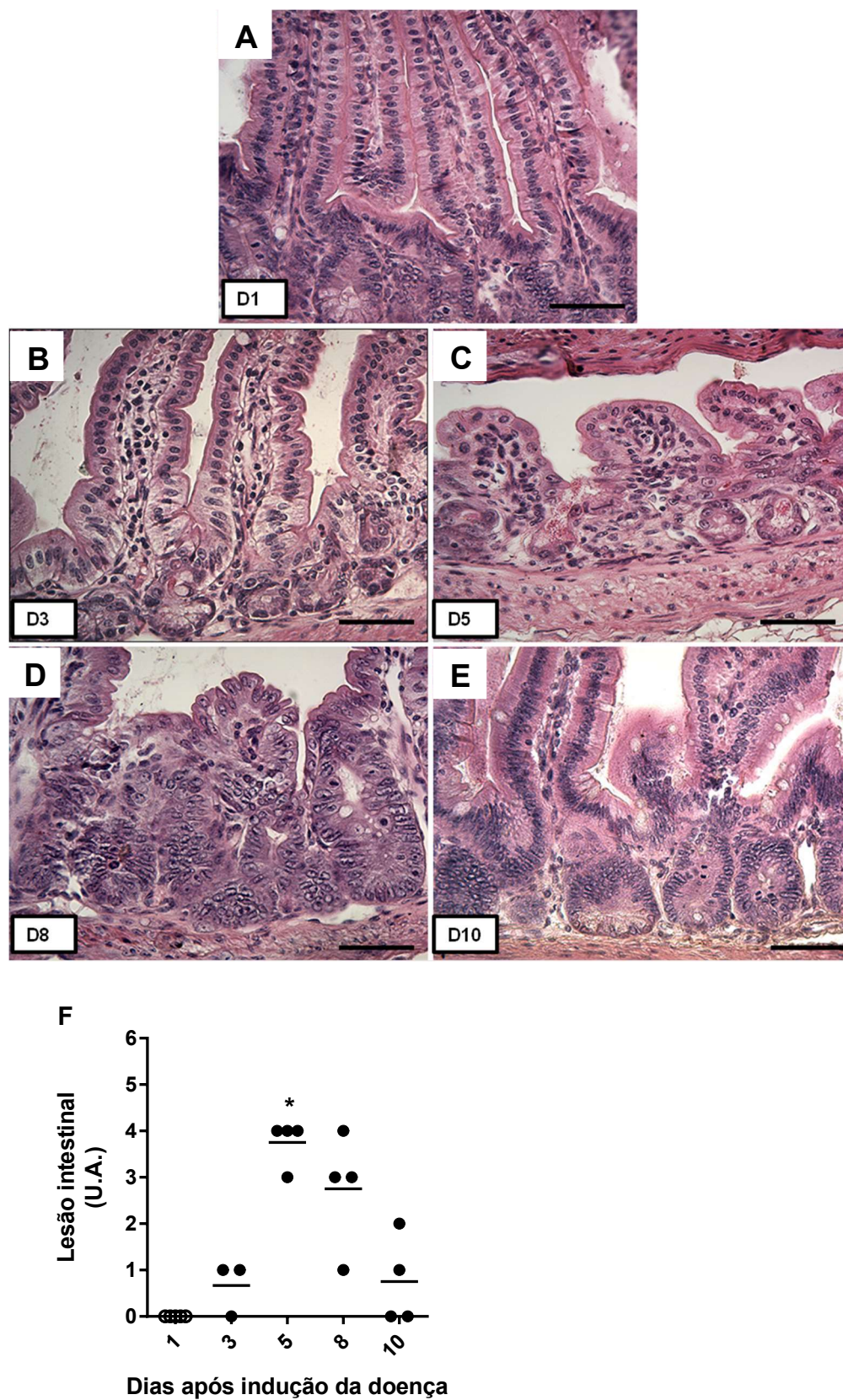


Figura 10- Alterações histopatológicas induzidas por 5-FU. A lesão intestinal de animais submetidos ao tratamento com 5-FU foi avaliada por análise histológica após coloração com H&E de fragmentos do íleo, sendo

representada pelas imagens obtidas com uma objetiva de 40x (A-E) e os respectivos escores histopatológicos (F). Os resultados estão expressos em média. $n = 3-4$ por grupo. $*p < 0,05$ vs. dia 1. A barra de escala corresponde a $80\mu\text{m}$. U.A: unidades arbitrárias.

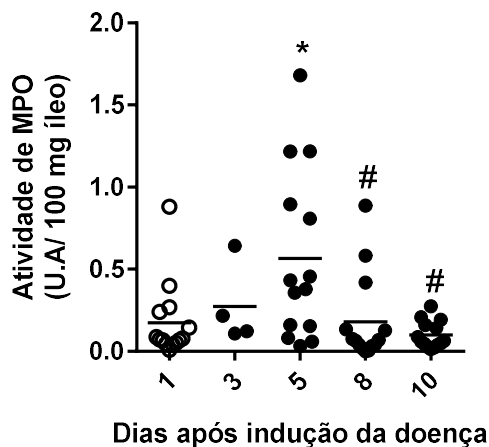


Figura 11- Tratamento com 5-FU leva ao aumento transitório da atividade de MPO no intestino. A atividade de MPO em fragmentos do íleo de animais selvagens foi determinada nos tempos indicados do protocolo experimental. Os resultados estão expressos em média. $n = 3-14$ por grupo. $*p < 0,05$ vs dia 1 ou $#p < 0,05$ vs dia 5. U.A: unidades arbitrárias.

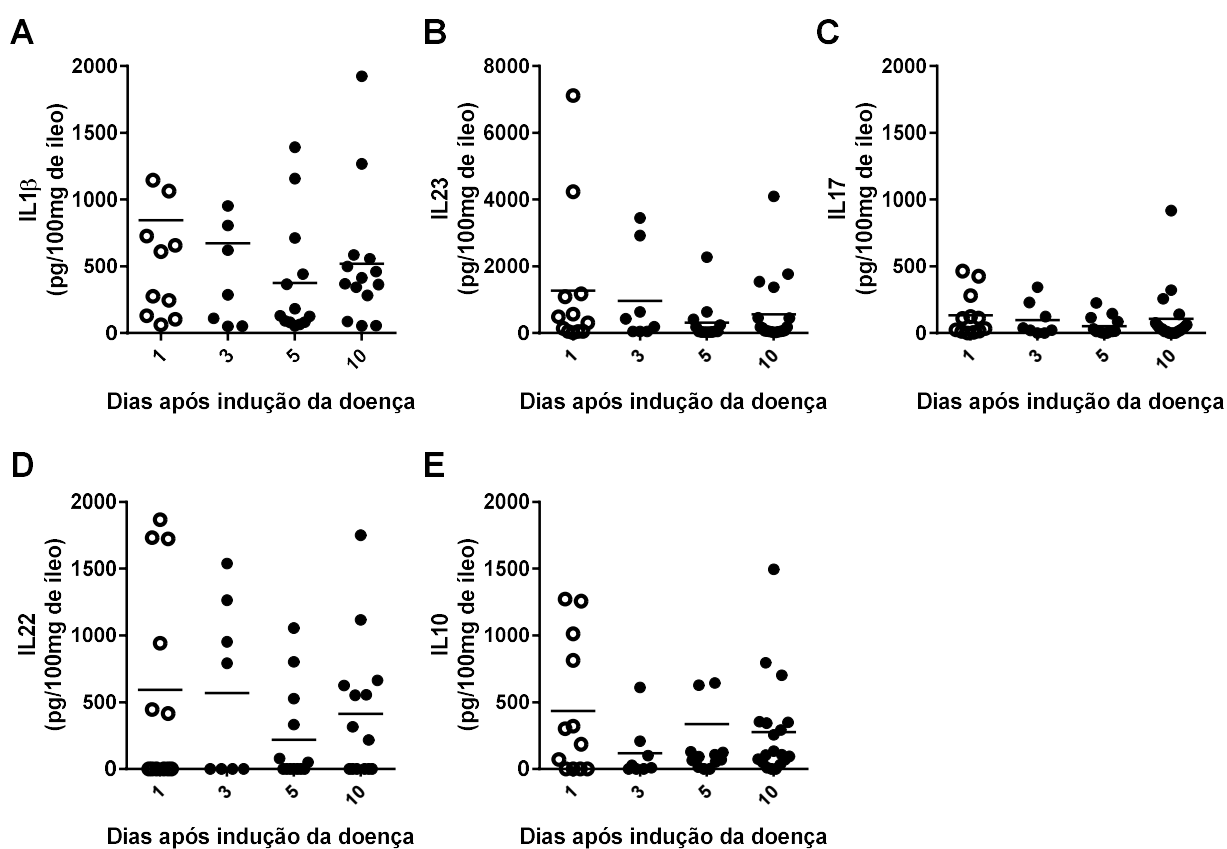


Figura 12- Análise da concentração de citocinas inflamatórias no tecido do íleo de animais selvagens submetidos à quimioterapia com 5-FU. O tecido do íleo de animais selvagens foi coletado nos dias indicados do

protocolo experimental para determinação da concentração das citocinas IL1 β (A), IL23 (B), IL17 (C), IL22 (D) ou IL10 (E) por ELISA. Os resultados estão expressos em média. n= 8-19 por grupo.

A fim de avaliar o comprometimento da função de barreira intestinal induzida pelo quimioterápico, foi determinada a concentração de azul de Evans no intestino delgado e plasma de animais submetidos à mucosite, após 24 horas da administração desse corante por gavagem oral. No 5º dia após indução da mucosite, observou-se uma maior concentração de azul de Evans nos diferentes sítios analisados, o que indica um aumento da permeabilidade intestinal (Figura 13). Além disso, a função de barreira foi avaliada por meio da análise da expressão dos genes *Zo-1*, *Ocludina* e *Claudina-3* no intestino delgado de animais tratados com 5-FU (Figura 14). A expressão do gene *Zo-1* não é alterada ao longo do protocolo experimental (Figura 14A). No entanto, há uma redução na expressão de *Ocludina* e *Claudina-3* no 5º dia do protocolo experimental, como indicados nas Figuras 14B, C.

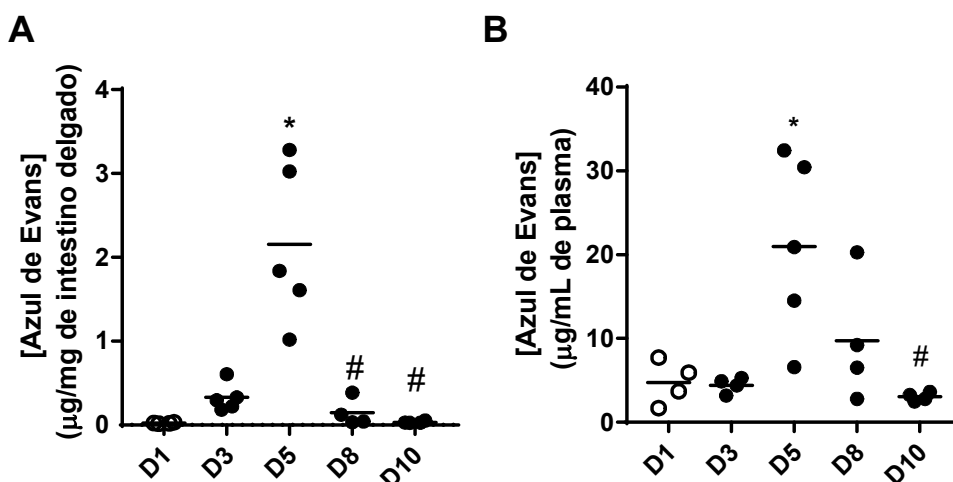


Figura 13- Tratamento com 5-FU leva ao aumento da permeabilidade intestinal. Animais selvagens submetidos à quimioterapia com 5-FU foram eutanasiados nos tempos indicados, 24 horas após receberem uma solução de azul de Evans por via oral, para a determinação da concentração do corante em amostras de intestino delgado (A) e plasma (B). Os resultados estão expressos em média. n= 4-6 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 e #p<0,05 vs. dia 5.

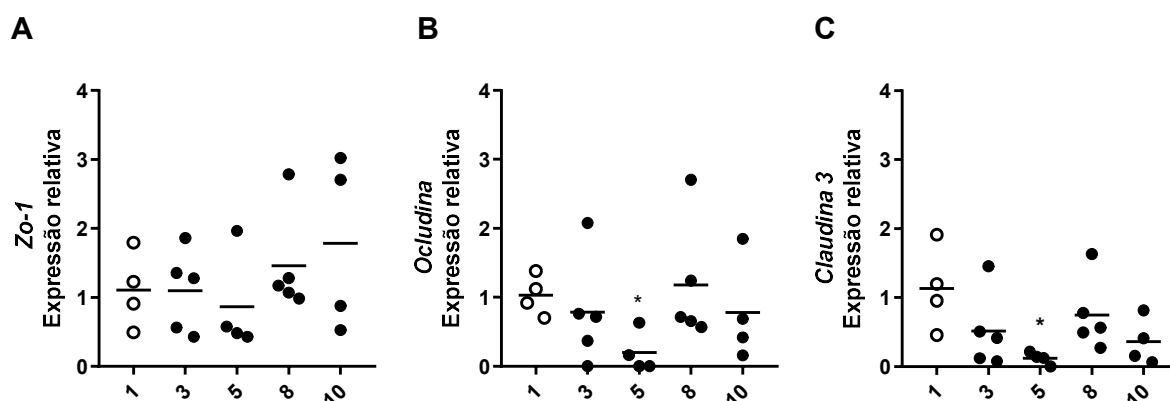


Figura 14- Análise da expressão de genes relacionados à manutenção da função de barreira do intestino durante o curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU. A expressão dos genes *Zo-1* (A), *Occludina* (B) e *Claudina-3* (C) foi avaliada por qPCR em amostras de íleo de animais submetidos à quimioterapia com 5-FU, nos dias 1, 3, 5, 8 e 10 do protocolo experimental. Os resultados estão expressos em média. n= 4-5 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1.

Além das alterações clínicas, histológicas, inflamatórias e de permeabilidade intestinal, a quimioterapia com 5-FU levou a alterações de composição da microbiota. A fim de quantificar e identificar os táxons bacterianos envolvidos nessas alterações, as fezes de animais WT foram inoculadas nos meios seletivos Bile esculina, MacConkey e MRS, durante o curso do protocolo experimental (Figura 15). Observou-se um aumento precoce do conteúdo de cocos Gram-positivo nas fezes dos camundongos, no 3º dia após indução da mucosite (Figura 15A). No 8º dia, há um aumento das contagens de bactérias nos três meios analisados (Figura 15A-C), indicando incremento do número de UFCs de cocos Gram-positivo, enterobactérias e bactérias ácido-láticas.

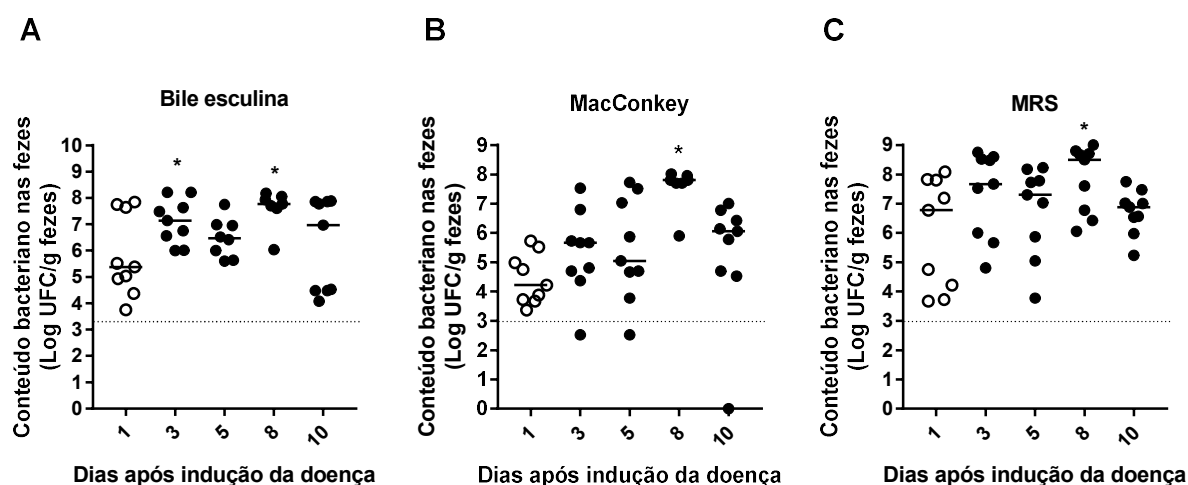


Figura 15- Caracterização da microbiota fecal de camundongos tratados com 5-FU por cultivo em meios seletivos. Fezes de animais selvagens submetidos à mucosite intestinal por 5-FU foram coletadas nos tempos

indicados na figura, para a inoculação nos meios sólidos Bile esculina (A), MacConkey (B) e MRS (C). Os resultados estão expressos em mediana. n=7-9 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 e #p<0,05 vs. dia 5. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

As alterações da composição e estrutura da microbiota induzidas pelo quimioterápico foram determinadas por meio do sequenciamento da região 16S do DNA bacteriano, extraído de fezes de camundongos submetidos à quimioterapia, no 8º dia após indução da doença (Figura 16). A análise de abundância relativa das cinco famílias com maior proporção de táxons detectados entre os cinco filos mais abundantes revelou uma aparente redução das famílias Muribaculaceae e Prevotellaceae, do filo Bacteroidota, e da família Lachnospiraceae do filo Firmicutes entre os animais que receberam quimioterapia, em relação aos animais tratados com PBS (Figura 16A). Além disso, houve um aumento relativo do conteúdo de membros das famílias Bacteroidaceae, do filo Bacteroidota, da família Helicobacteraceae, do filo Campilobacterota, da família Enterococcaceae, do filo Firmicutes, e da família Akkermansiaceae, do filo Verrucomicrobiota, além de membros de uma família não identificada de Proteobacteria (Figura 16A). Apesar dessas mudanças de composição, não houve alterações significativas na alfa-diversidade da microbiota (Figura 16B). Essas alterações discretas determinaram uma segregação entre os animais controle e aqueles tratados com 5-FU na análise de coordenadas principais, sugerindo uma mudança de composição significativa entre os dois grupos (Figura 16C).

Em nível de espécie, foi possível detectar uma redução relativa expressiva do conteúdo de espécies não cultiváveis e desconhecidas da família Muribaculaceae e um aumento expressivo de *Akkermansia muciniphila*, de espécies desconhecidas do gênero *Bacteroides*, além de *Helicobacter hepaticus* no grupo tratado com 5-FU em relação ao grupo tratado com PBS (Figura 17).

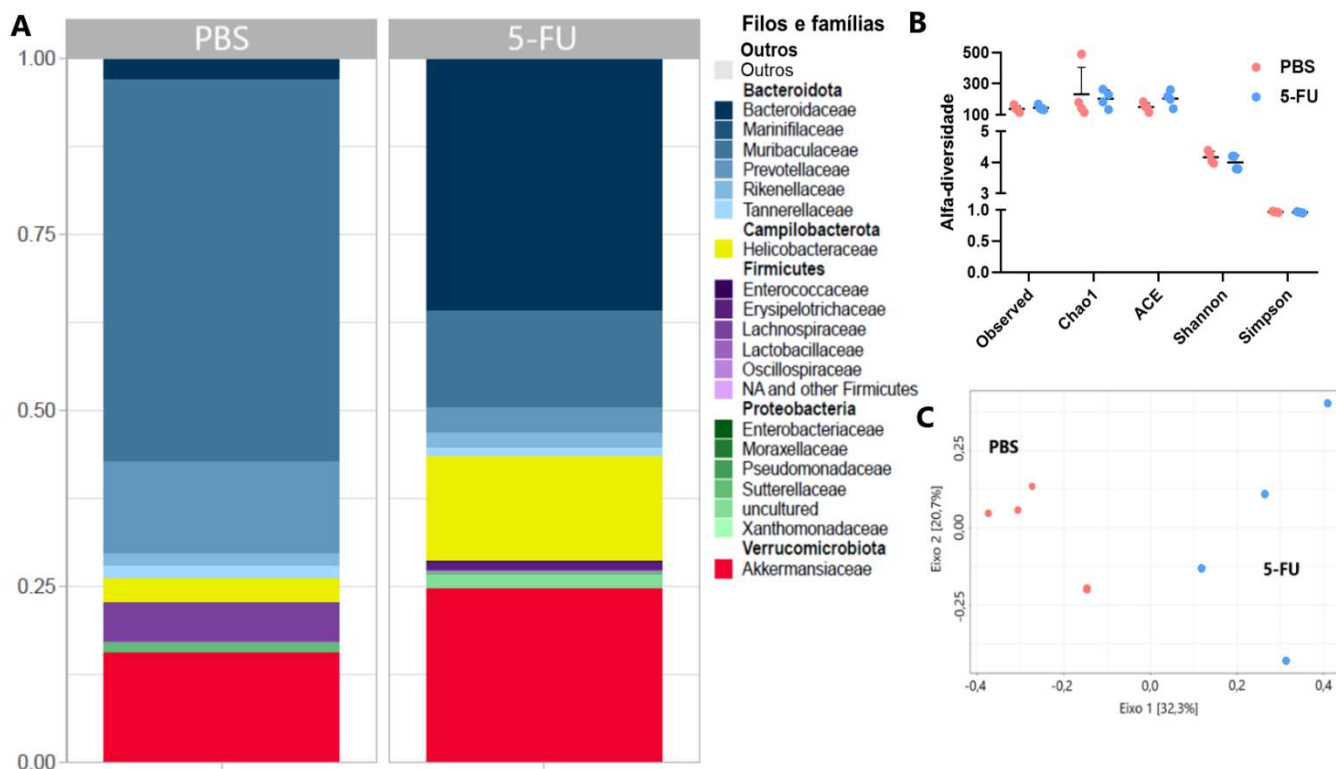


Figura 16- Tratamento com 5-FU leva a alterações na composição e estrutura da microbiota fecal de camundongos no oitavo dia do protocolo experimental. Fezes de animais WT foram coletadas no 8º dia após indução da mucosite intestinal por 5-FU para a análise da microbiota intestinal, por meio do sequenciamento de DNA 16S. Após as análises, foram determinadas a abundância relativa das 5 famílias com maior número de leituras entre os 5 filos mais representados (A), a alfa-diversidade da microbiota, avaliado por cinco índices diferentes (B) e a beta-diversidade da microbiota, por meio de análise de coordenadas principais (C), nos dois grupos experimentais.

O comprometimento da integridade do epitélio intestinal, indicado nas análises histopatológicas do tecido do íleo (Figura 10) ou de permeabilidade intestinal (Figuras 13 e 14) e as alterações microbiológicas (Figuras 15-17) foram seguidas de translocação bacteriana para o fígado, no 8º e 10º dias da doença (Figura 18A). Para caracterizar os principais táxons bacterianos da microbiota intestinal presentes no fígado no 8º dia, foram utilizados os meios de cultivo Bile esculina (enterococos ou estreptococos grupo D), MacConkey (enterobactérias) e MRS (bactérias ácido-láticas), sendo evidenciado um predomínio da translocação de cocos Gram-positivo e enterobactérias e ausência de bactérias ácido-láticas no fígado dos animais submetidos à quimioterapia com 5-FU (Figura 18B).

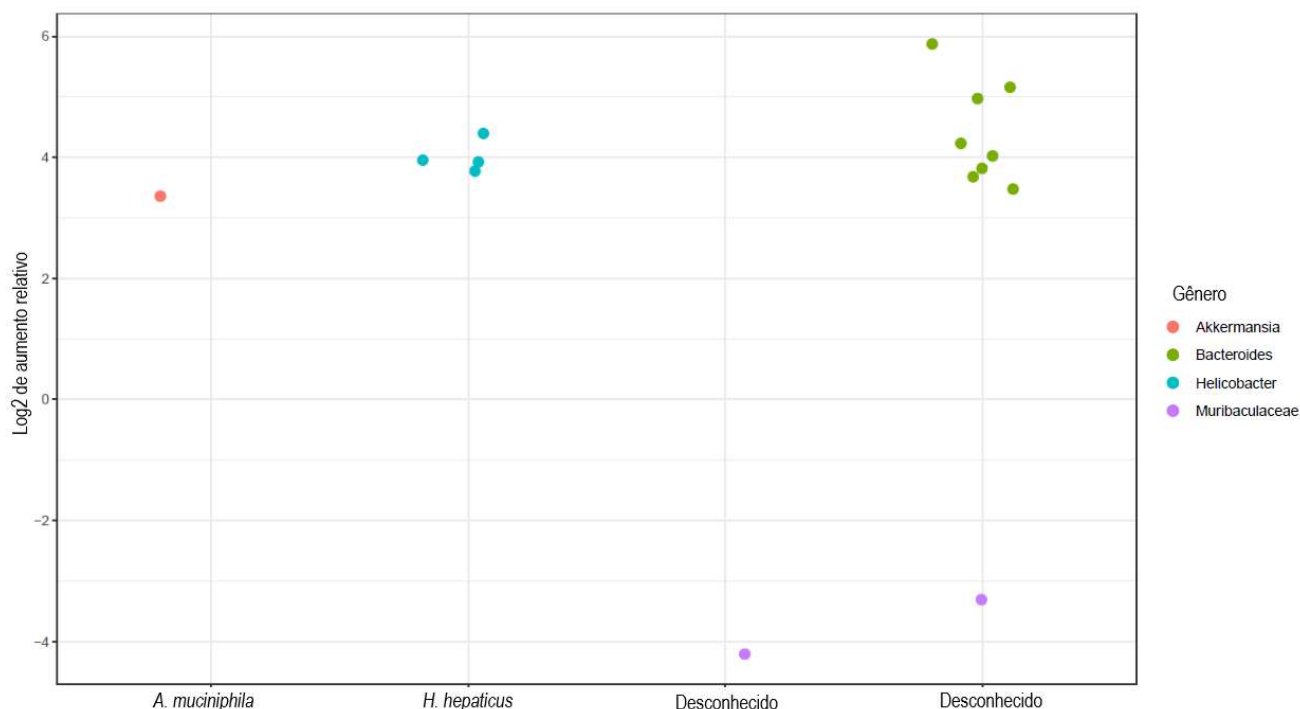


Figura 17- Tratamento com 5-FU leva a aumento significativo do conteúdo relativo de *Akkermansia muciniphila*, *Helicobacter hepaticus* e *Bacteroides* sp.. Fezes de animais WT foram coletadas no 8º dia após indução da mucosite intestinal por 5-FU para a análise da microbiota intestinal, por meio do sequenciamento de DNA 16S. Após as análises, foram determinadas a abundância relativa das 5 famílias com leituras passíveis de identificação a nível de gênero. Os resultados estão expressos como $\log_2$ da média da variação relativa entre o grupo tratado 5-FU em relação ao grupo tratado com PBS.

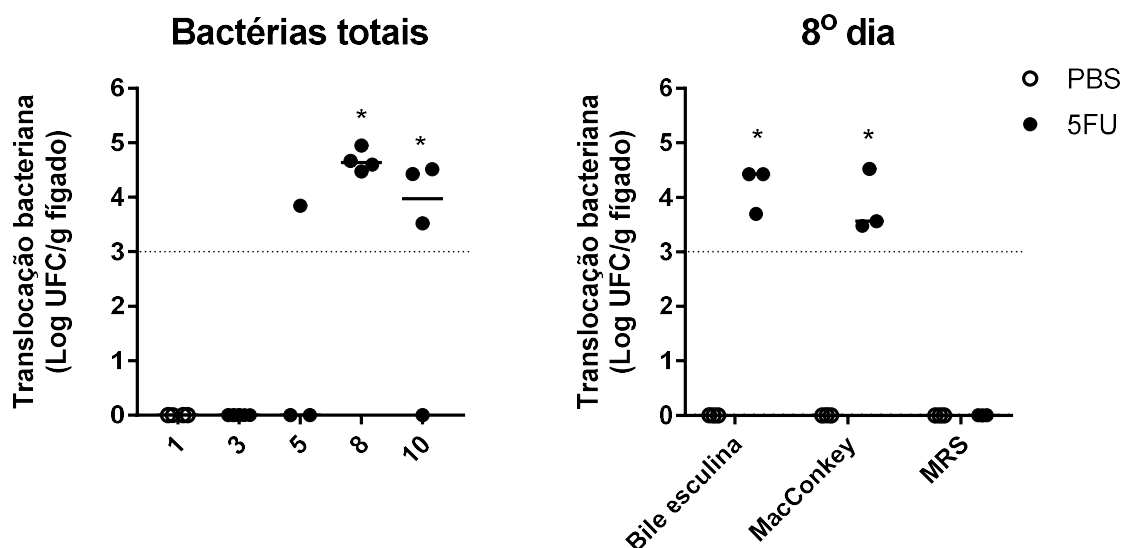


Figura 18- Tratamento com 5-FU induz translocação de bactérias intestinais para o fígado. Animais selvagens submetidos à quimioterapia com 5-FU foram eutanasiados nos tempos determinados, para a análise da translocação bacteriana para o fígado em meio sólido BHI (A). No 8º dia após indução da doença, a translocação de bactérias intestinais também foi avaliada nos meios sólidos Bile esculina, MacConkey e MRS (B). Os resultados

estão expressos em mediana. n= 3-4 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 5. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

1.2 – Efeito da exposição à ampicilina sobre a susceptibilidade à quimioterapia

Uma vez que a perda de função de barreira no intestino e translocação bacteriana coincidiram com a morte dos animais submetidos à quimioterapia com 5-FU, buscou-se avaliar o efeito da administração de um antimicrobiano de amplo espectro, ampicilina, na morbidade e mortalidade causada pela quimioterapia. Inicialmente, foi avaliado o efeito da exposição à ampicilina (1g/L na água de beber ao longo de todo o protocolo experimental) no conteúdo bacteriano das fezes de camundongos tratados com 5-FU, por meio de cultivo em meios sólidos (BHI, MacConkey ou MRS) (Figura 19). Não houve diferença do número de UFCs detectadas nos meios BHI e MacConkey entre os animais que receberam PBS e água em relação aos animais expostos à ampicilina e tratados com PBS (Figura 19A e 19B). A exposição à ampicilina levou à redução drástica da contagem de UFCs de bactérias ácido-láticas para valores abaixo do limite de detecção tanto em animais tratados com PBS ou naqueles tratados com 5-FU (Figura 19C). Além disso, o tratamento com ampicilina promoveu redução na contagem de UFCs nas fezes dos animais tratados com 5-FU para valores indetectáveis também nos meios BHI e MacConkey (Figura 19A e 19B).

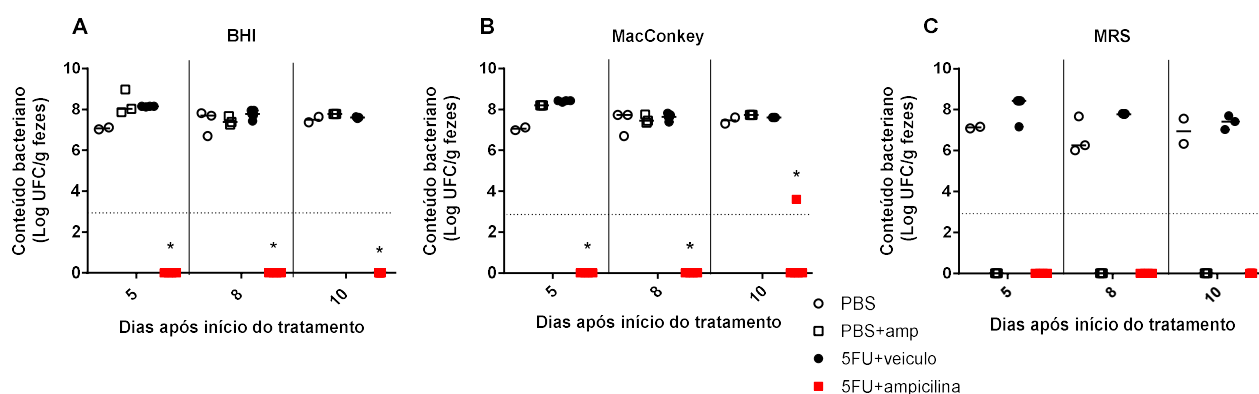


Figura 19- Exposição à ampicilina reduz o conteúdo de grupos bacterianos aeróbios nas fezes de animais tratados com 5-FU. Fezes de animais selvagens submetidos à mucosite intestinal foram coletadas para o cultivo nos meios sólidos BHI (A), MacConkey (B) e MRS (C). Os resultados estão expressos em mediana. n=7-9 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

Posteriormente, foram avaliados os parâmetros hematológicos, clínicos e a taxa de sobrevivência após o tratamento com ampicilina de animais submetidos à mucosite intestinal (Figura 20). A leucopenia induzida pela injeção de 5-FU foi semelhante entre os grupos tratados com veículo ou ampicilina (Figura 20A). A perda de peso corporal também foi semelhante entre o 3º e 8º dias. Contudo, os animais expostos a ampicilina que receberam a quimioterapia

apresentam uma recuperação do peso corporal no 10º dia em relação aos animais tratados com 5-FU e expostos a água (Figura 20B). O escore clínico não difere entre ambos os grupos citados entre os dias 1 e 8 do protocolo experimental. Porém, os animais tratados com 5-FU não expostos a ampicilina apresentam um escore clínico maior que seu respectivo controle, diferença não encontrada entre animais expostos a ampicilina (Figura 20C). Esse quadro clínico ligeiramente mais brando foi associado a uma taxa de sobrevida maior entre animais tratados com 5-FU expostos a ampicilina (71% de sobrevida) em relação a animais que receberam quimioterapia, mas não foram expostos ao antimicrobiano (55% de sobrevida) (Figura 20D).

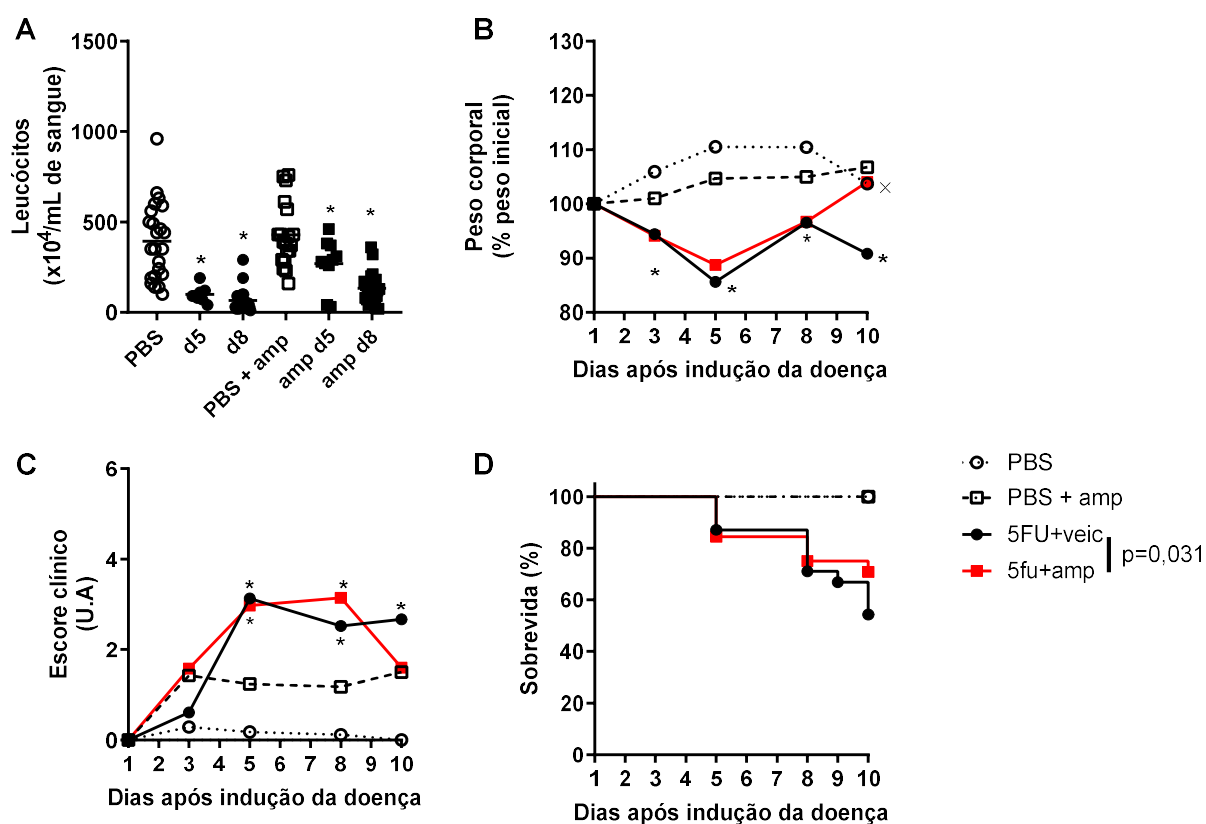


Figura 20- Avaliação dos parâmetros hematológicos, clínicos e da taxa de sobrevida após tratamento com ampicilina de animais submetidos à quimioterapia com 5-FU. Animais WT foram expostos a veículo ou ampicilina durante o protocolo de quimioterapia para análise da contagem de leucócitos (A), do peso corporal (B), escore clínico (C) e taxa de sobrevida (D). Os resultados estão expressos em média. n= 17-34 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 e X p<0,05 vs. 5-FU+veículo. U.A: unidades arbitrárias.

A lesão intestinal é observada no 5º dia após indução da mucosite, de forma semelhante entre os animais que receberam quimioterapia e foram expostos ou não a ampicilina (Figura 21). No dia 5 do protocolo experimental, também há aumento da atividade de MPO no íleo dos animais de ambos os grupos, porém, os animais em quimioterapia tratados com ampicilina apresentam menor atividade de MPO em relação aos animais que receberam 5-FU e veículo (Figura 22). De maneira importante, a exposição à ampicilina reduziu a translocação bacteriana

para o fígado, no 8º dia do protocolo experimental em animais que receberam 5-FU (Figura 23).

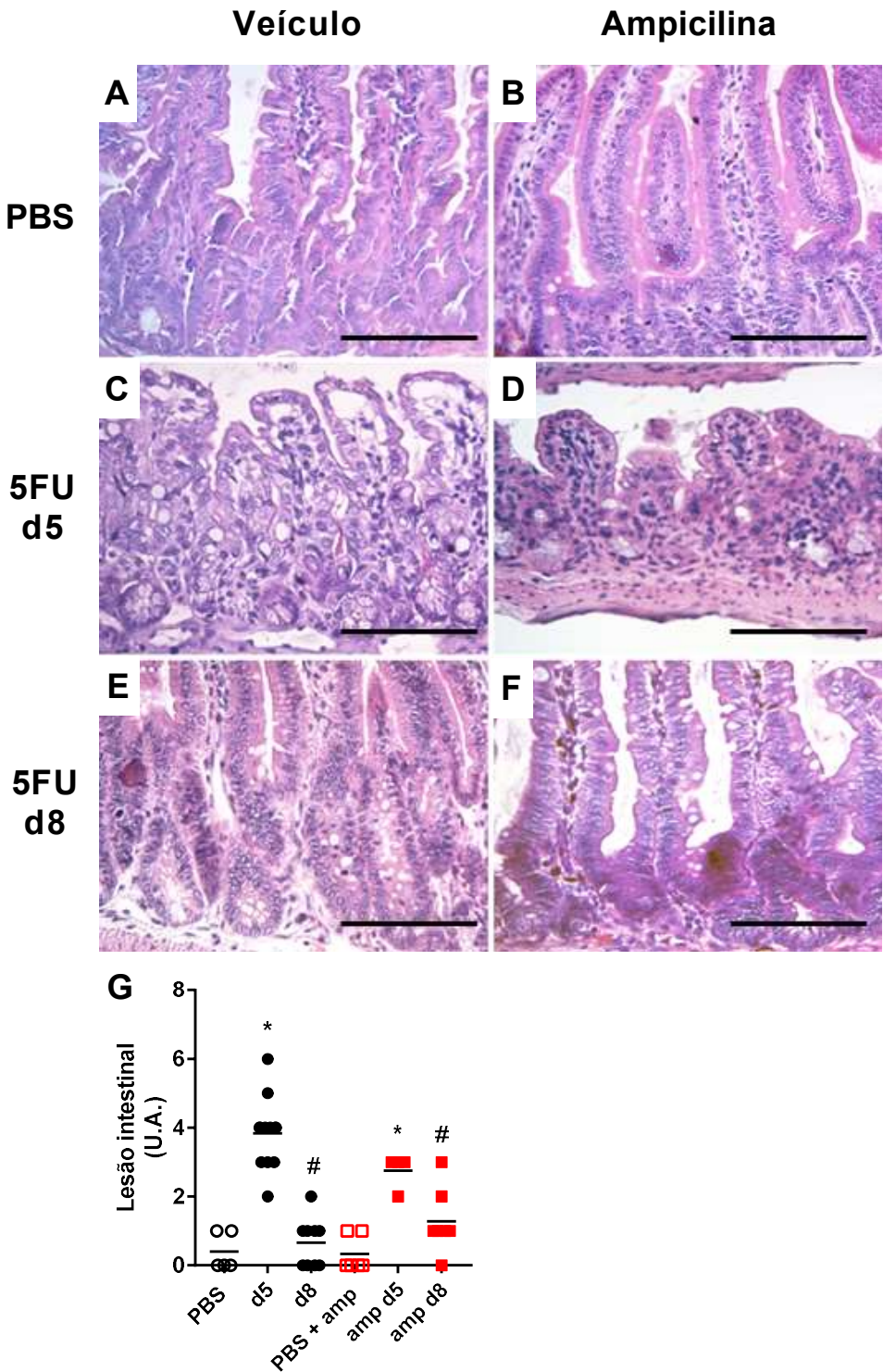


Figura 21- Avaliação do tratamento com ampicilina na lesão intestinal em animais submetidos à mucosite intestinal. Animais WT foram expostos a veículo ou ampicilina durante o protocolo de quimioterapia e o intestino delgado foi coletado no 5º ou 8º dias após início do tratamento com 5-FU, para análise da lesão intestinal. A lesão

intestinal foi avaliada por análise histopatológica após coloração com H&E de fragmentos do íleo, sendo representada pelas imagens obtidas com uma objetiva de 40x (A-F) e os respectivos escores histopatológicos (G). Os resultados estão expressos em média. n= 10-16 por grupo. * $p < 0,05$ vs dia 1 ou # $p < 0,05$ vs. dia 5. A barra de escala corresponde a 80 μ m.

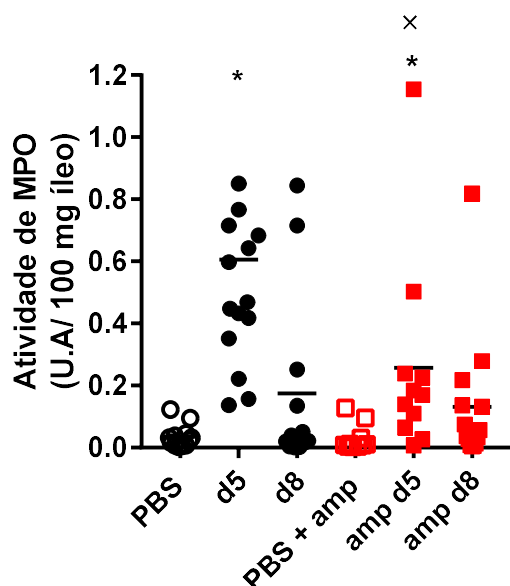


Figura 22- Avaliação da atividade de MPO após tratamento com ampicilina de animais submetidos à mucosite intestinal. Animais WT foram tratados com veículo ou ampicilina e o intestino delgado coletado no 5º ou 8º dias após início do tratamento com 5-FU, para análise da atividade de MPO. Os resultados estão expressos em média. n= 10-16 por grupo. * $p < 0,05$ vs. dia 1 ou # $p < 0,05$ vs. dia 5. U.A.: unidades arbitrárias.

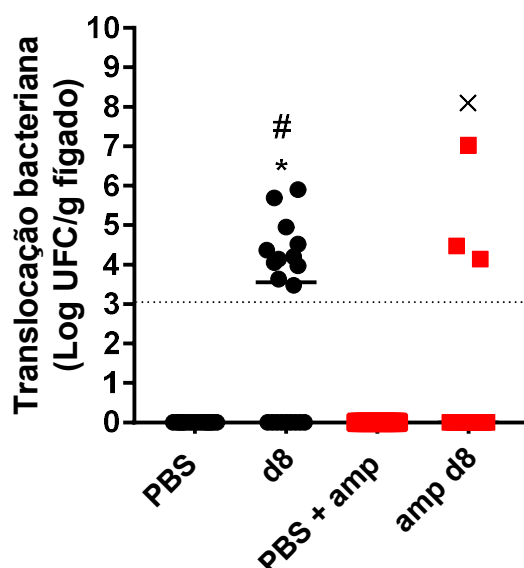


Figura 23- Tratamento com ampicilina reduz a translocação bacteriana para o fígado. Animais WT foram expostos a veículo ou ampicilina durante o protocolo de quimioterapia e o fígado coletado no 8º dia após início do

tratamento com 5-FU, para cultivo em meio sólido MH. Os resultados estão expressos em mediana. n= 16-20 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1. X p<0,05 vs. veículo. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

Capítulo II – Tratamento com 5-FU induz alteração do metabolismo de triptofano e da atividade de AHR e a ativação de AHR protege da morbidade induzida pela quimioterapia.

Os resultados demonstrados até aqui mostram que a quimioterapia com 5-FU leva ao desenvolvimento de mucosite intestinal, com aumento da permeabilidade intestinal, alterações da microbiota e consequente translocação bacteriana para sítios extra intestinais e morte. Isso é reforçado pelo fato do tratamento com antimicrobianos impedir a translocação bacteriana e reverter parcialmente a morte. A partir da caracterização do modelo de mucosite intestinal, buscou-se avaliar o metabolismo de TRP e a atividade de AHR, potenciais mediadores da manutenção da integridade epitelial intestinal, após o tratamento com 5-FU. A concentração de TRP e dos seus metabólitos (KYN, IAA, Iald, I3S) foi determinada no plasma (Figura 24) e intestino delgado (Figura 25) de animais WT tratados com 5-FU, por meio da técnica de UPLC-MS/MS. No plasma, a concentração de TRP aumenta no 3º dia após início do tratamento com 5-FU e retorna aos níveis basais no dia 5 do protocolo experimental (Figura 24A). De forma semelhante, os níveis plasmáticos de KYN, Iald e IAA aumentam no 3º dia da doença, porém, esse aumento também é observado no dia 10 do protocolo experimental para KYN e Iald (Figuras 24B-D). Não houve alterações expressivas da concentração plasmática de I3S ao longo do protocolo experimental (Figura 24E). No intestino, não houve variação nas concentrações de TRP e I3S ao longo do protocolo experimental (Figura 25A e 25E). Porém, houve queda das concentrações teciduais de todos os outros metabólitos, variando quanto ao momento dessa queda de acordo com o metabólito: 10º dia do protocolo para KYN, 5º e 10º dias para IAA e 3º, 5º e 8º dias para Iald (Figura 25B-D).

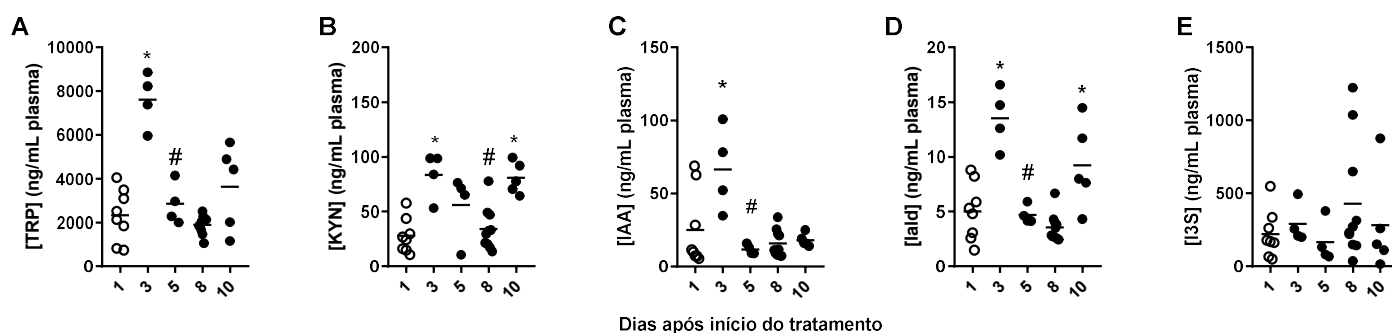


Figura 24- Tratamento com 5-FU leva a alteração da concentração plasmática de TRP e de seus metabólitos. O plasma de animais WT foi coletado nos tempos indicados do protocolo experimental para determinação da concentração de TRP (A), KYN (B) IAA (C), Iald (D) e I3S (E). n= 4-10 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 5.

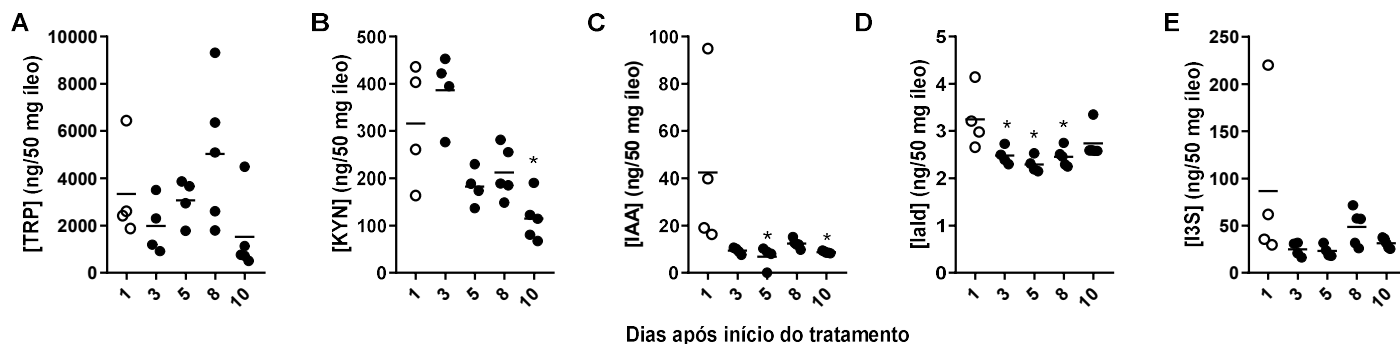


Figura 25- Tratamento com 5-FU leva a alteração da concentração de TRP e de seus metabólitos no íleo. O íleo de animais WT foi coletado nos tempos indicados do protocolo experimental para determinação da concentração de TRP (A), KYN (B) IAA (C), Iald (D) e I3S (E). n= 4-10 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 5.

A ativação de AHR foi determinada a partir da utilização de animais *LacZ^{XRE}*, repórteres para ativação desse receptor. Inicialmente, foram avaliadas as alterações induzidas pelo quimioterápico nessa linhagem de camundongos. De maneira semelhante ao observado para os animais C57BL/6, houve leucopenia no 5º e 8º dias após indução da doença (Figura 26A), perda de peso corporal no 3º e 5º dias (Figura 26B) e aumento do escore clínico no 5º dia do protocolo experimental (Figura 26C). A lesão intestinal também foi observada no dia 5 após indução da mucosite (Figura 27A-C) e a translocação bacteriana foi evidenciada no 8º dia do protocolo experimental (Figura 28). A análise desses parâmetros revela que os animais *LacZ^{XRE}* se comportaram de forma semelhante aos animais WT durante o curso da mucosite intestinal.

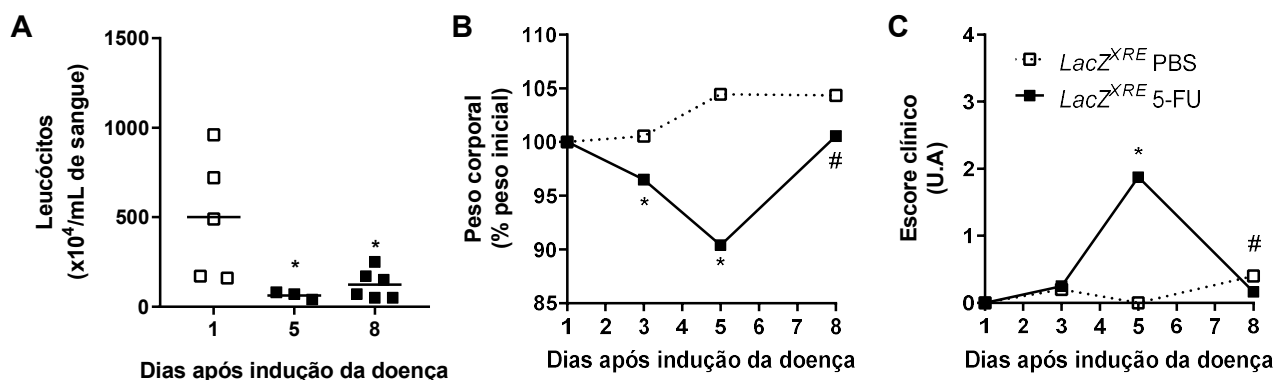


Figura 26- Avaliação de parâmetros hematológicos e clínicos em animais *LacZ^{XRE}* durante o curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais *LacZ^{XRE}* foram tratados com 5-FU e acompanhados quanto à

contagem de leucócitos totais no sangue (A), peso corporal (B) e escore clínico (C). Os resultados estão expressos em média. $n=3-8$ por grupo. $*p<0,05$ vs. dia 1. $\#p<0,05$ vs. Dia 5. U.A: unidades arbitrárias.

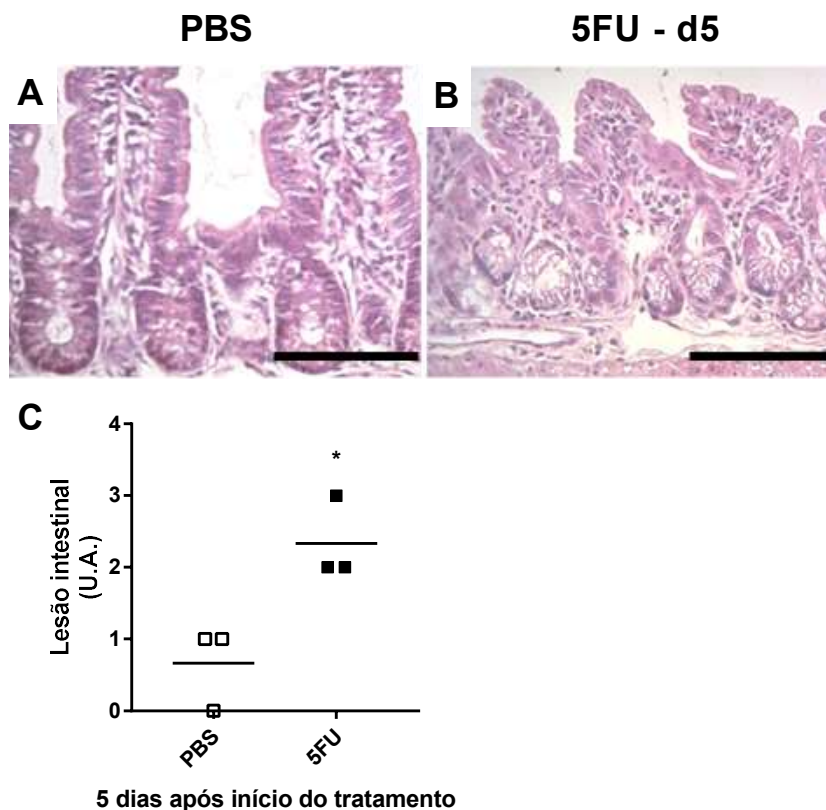


Figura 27- Análise histopatológica do tecido do íleo de animais *LacZ^{XRE}* submetidos à mucosite intestinal. Após 5 ou 8 dias do início da administração de 5-FU, foi realizada a análise histológica no tecido do íleo de animais *LacZ*. As lâminas foram coradas com H&E e as imagens foram obtidas com uma objetiva de 40x. A barra de escala corresponde a 80 μ m. Os resultados estão expressos em média. $n=3$ por grupo. $*p<0,05$ vs. dia.

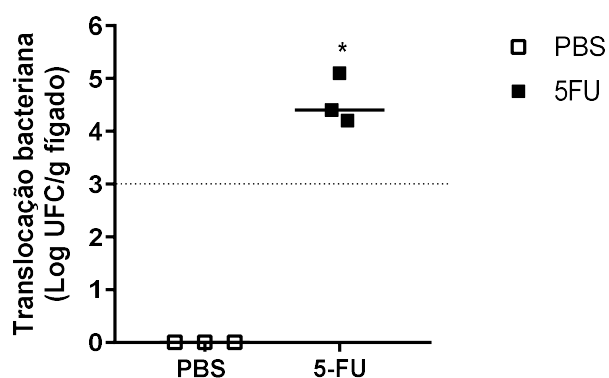


Figura 28- Análise da translocação bacteriana para o fígado de animais *LacZ^{XRE}* submetidos à mucosite intestinal. O fígado de animais *LacZ^{XRE}* foi coletado para o cultivo em meio sólido MH, para análise da translocação bacteriana, no 8º dia após início do tratamento com 5-FU. Os resultados estão expressos em mediana. $n=3$ por grupo. $*p<0,05$ vs dia 1. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

Uma vez que os animais repórteres para atividade de AHR respondem à quimioterapia de maneira semelhante aos animais selvagens, utilizamos tais animais para avaliar a atividade de AHR ao longo do protocolo experimental de quimioterapia com 5-FU. Observou-se um aumento da atividade dessa enzima no fígado, no 3º dia do protocolo experimental, o que indica uma maior ativação de AHR nesta altura do protocolo experimental (Figura 29A). No tecido do íleo, houve uma redução da atividade da enzima, no 5º dia após indução da mucosite intestinal, o que revela uma menor ativação desse receptor (Figura 29B). Em ambos os tecidos, observou-se um retorno aos níveis basais da atividade de beta-galactosidase no 8º dia do protocolo experimental (Figura 29A-B). Em conjunto, os achados demonstram que as alterações da atividade de AHR acompanham as variações das concentrações de metabólitos de TRP na circulação e no tecido do íleo durante o protocolo experimental de mucosite intestinal induzida por quimioterapia com 5-FU.

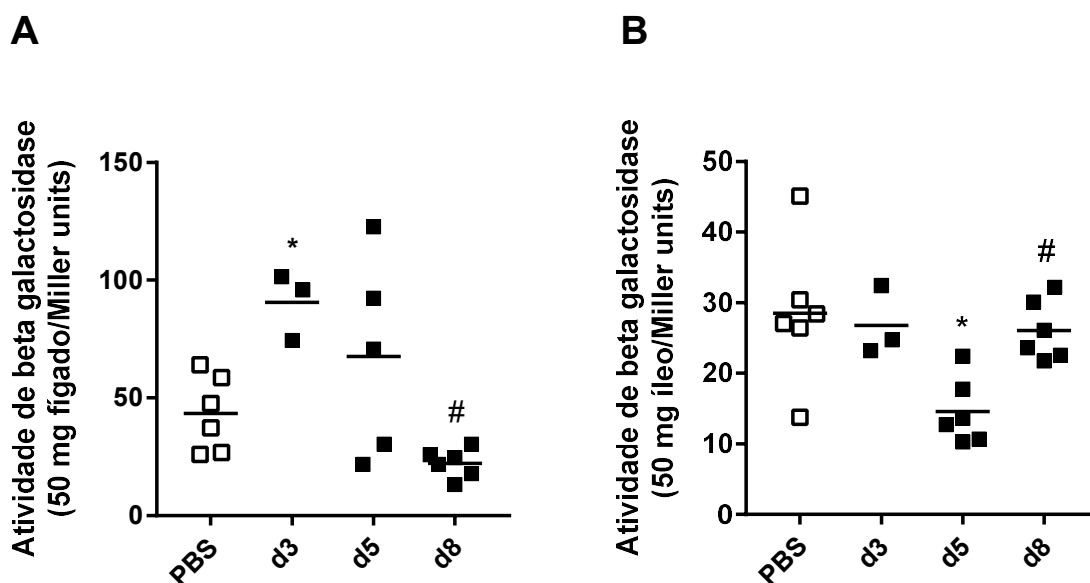


Figura 29- Avaliação da atividade de beta-galactosidase em fragmentos de fígado ou íleo de animais *LacZ^{XRE}*. O íleo e fígado de animais *LacZ^{XRE}* foram retirados para a análise de atividade beta-galactosidase nos dias 3, 5 ou 8 após início do tratamento com 5-FU. Os resultados estão expressos em média. n= 3-6 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 3 (A) ou 5 (B).

Assim, o próximo passo foi determinar o papel do AHR na resposta à mucosite intestinal induzida por 5-FU a partir da análise das alterações induzidas pelo quimioterápico, em animais *Ahr^{-/-}*. A quantificação de leucócitos totais no sangue mostrou uma leucopenia em ambos os grupos, WT ou *Ahr^{-/-}* (Figura 30A). Os animais WT apresentaram perda de peso corporal a

partir do 5º dia após início do tratamento com 5-FU. Nos animais *Ahr*^{-/-}, a perda de peso estava presente a partir do 3º dia do protocolo experimental, sendo significativamente maior em relação aos animais WT nos 3º e 5º dias (Figura 30B). O escore clínico dos animais WT aumentou significativamente nos dias 5 e 8 após indução da mucosite intestinal, ao passo que os animais *Ahr*^{-/-} apresentam aumento de escore clínico a partir do 5º dia, sendo mais expressivo em relação aos animais WT, no dia 5 do protocolo experimental (Figura 30C). Além disso, a taxa de sobrevivência dos animais *Ahr*^{-/-} foi significativamente menor em relação aos animais WT, o que indica uma maior susceptibilidade desses animais à mucosite intestinal induzida por 5-FU (Figura 30D).

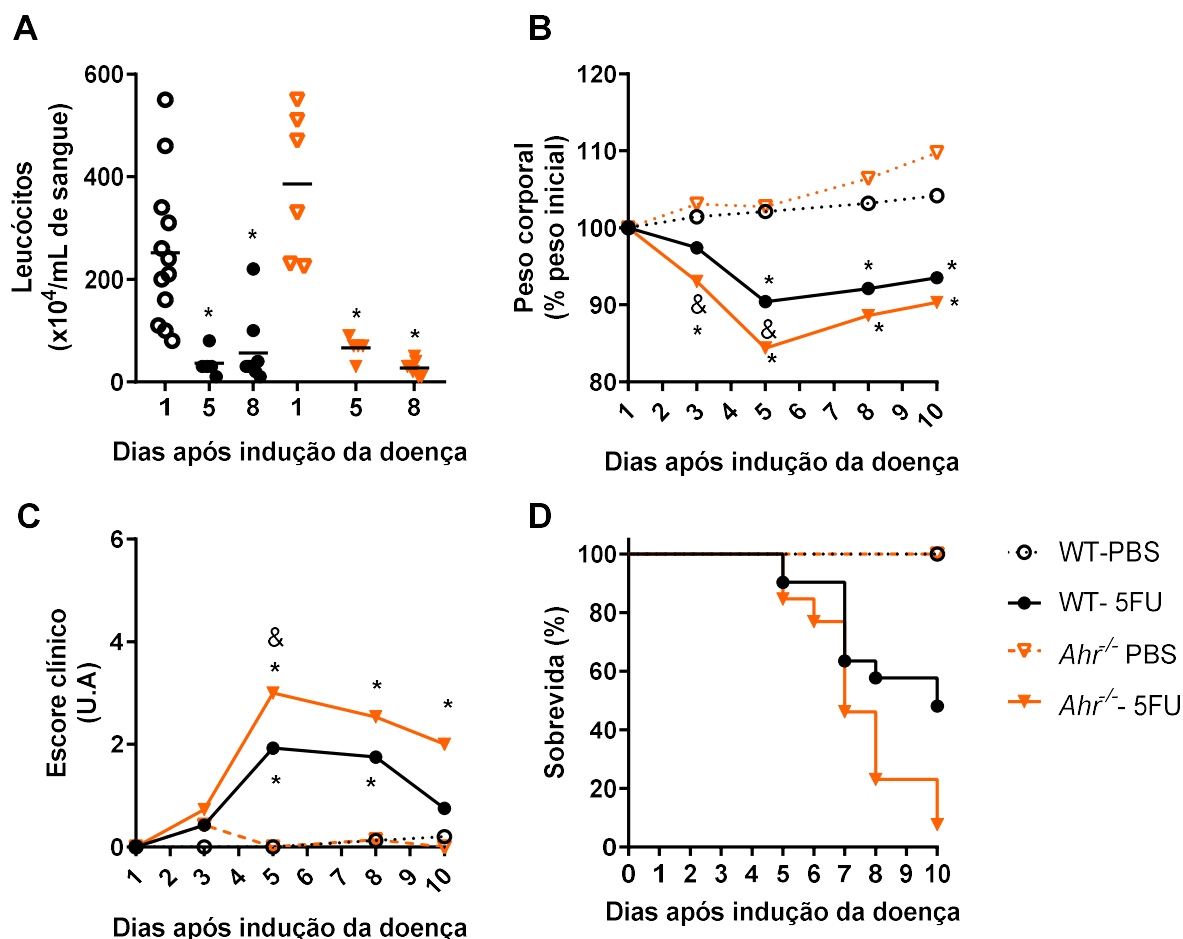


Figura 30- Avaliação dos parâmetros hematológicos, clínicos e da taxa de sobrevivência de animais *Ahr*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais WT ou *Ahr*^{-/-} foram tratados com 5-FU e acompanhados ao longo do tempo, para análise da contagem de leucócitos (A), peso corporal (B), escore clínico (C) e taxa de sobrevivência nos tempos indicados (D). Os resultados estão expressos em média. n= 12-26 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou &p<0,05 vs. WT. U.A: unidades arbitrárias.

A lesão intestinal nos animais *Ahr*^{-/-} também foi mais expressiva em relação às alterações histopatológicas encontrada no íleo dos animais WT, no dia 5 do protocolo experimental. No 8º dia após indução da mucosite, houve uma redução da lesão intestinal, porém, nos animais *Ahr*^{-/-}, essas alterações ainda eram significativas (Figura 31A, B). Não houve diferença na atividade de MPO entre os animais WT e *Ahr*^{-/-}, a qual aumenta no 5º dia do protocolo experimental em ambos os genótipos tratados com 5-FU (Figura 32).

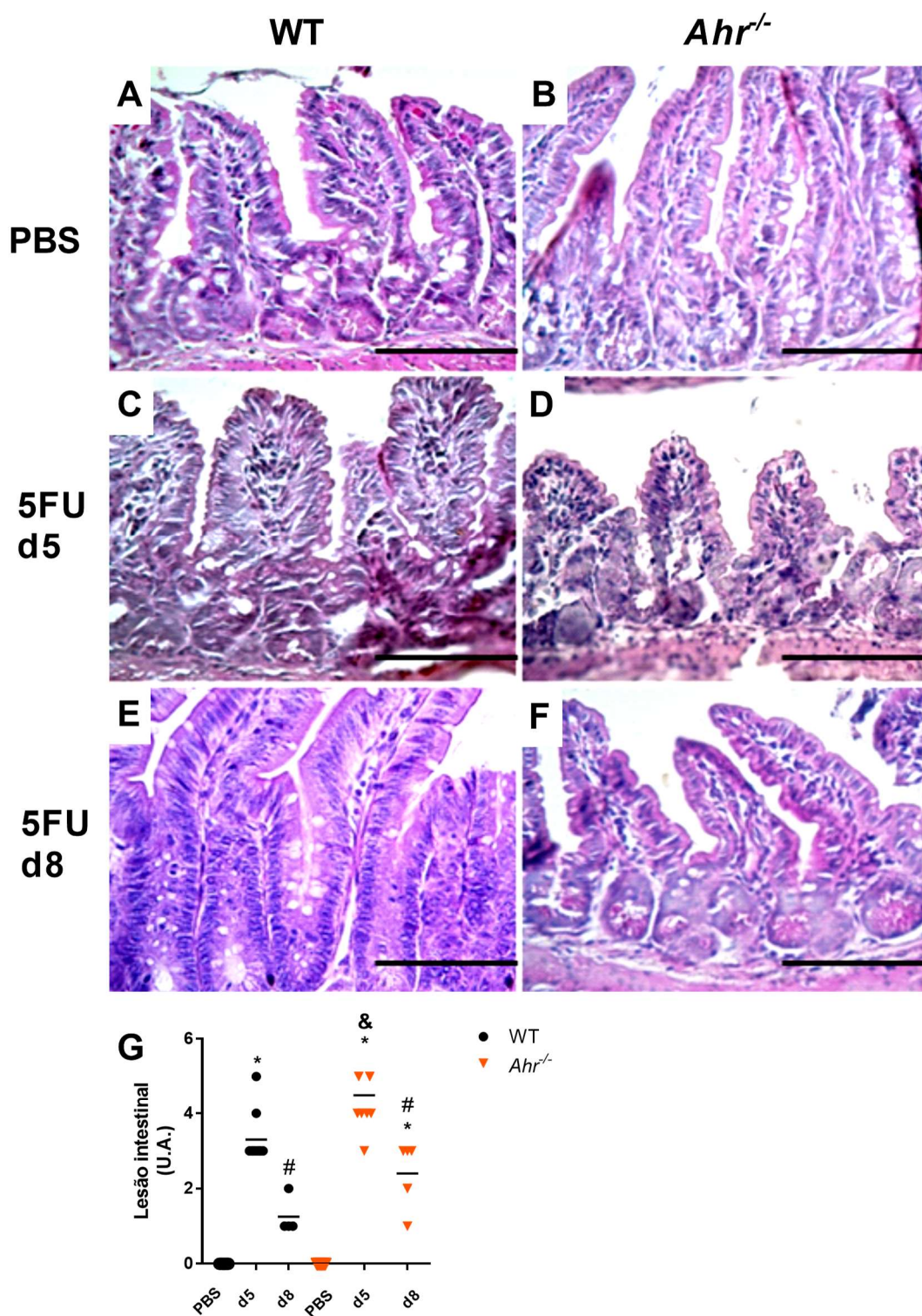


Figura 31- Avaliação da lesão intestinal no intestino em animais *Ahr*^{-/-} após tratamento com 5-FU. Animais WT ou *Ahr*^{-/-} foram submetidos à mucosite intestinal e o tecido do íleo coletado para análise histopatológica nos tempos indicados após coloração por H&E, sendo representada pelas imagens obtidas com uma objetiva de 40x (A-F) e os respectivos escores histopatológicos (G). Os resultados estão expressos em média. n= 5-11 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 5 ou &p<0,05 vs. WT. A barra de escala corresponde a 80µm.

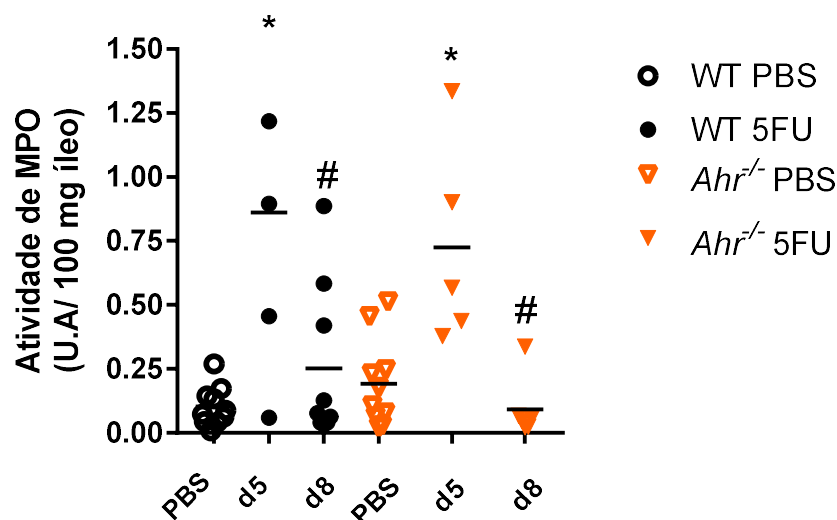


Figura 32- Avaliação da atividade de MPO no intestino em animais *Ahr*^{-/-} após tratamento com 5-FU. Animais WT ou *Ahr*^{-/-} foram submetidos à mucosite intestinal e o tecido do íleo coletado para análise atividade de MPO nos tempos indicados. Os resultados estão expressos em média. n= 5-11 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 5. U.A: unidades arbitrárias.

A fim de avaliar se a maior lesão do intestino estaria associada a uma permeabilidade intestinal aumentada, foi realizado o ensaio de azul Evans no plasma e em fragmentos do intestino delgado, no 5º dia após início do tratamento com 5-FU (Figura 33). Observou-se aumento da concentração de azul de Evans no plasma, de forma semelhante entre os grupos de animais WT ou *Ahr*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal (Figura 33A). No intestino, o aumento da concentração do corante foi detectado apenas nos animais *Ahr*^{-/-} (Figura 33B).

Uma vez que há aumento da permeabilidade intestinal no 5º dia da doença nos animais *Ahr*^{-/-}, buscou-se avaliar se esse aumento resulta em acentuação da translocação bacteriana para o fígado (Figura 34). No dia 5 após início do protocolo experimental, foi detectada a translocação para o fígado, de forma semelhante entre os grupos WT ou *Ahr*^{-/-}. No 8º dia do protocolo experimental, a translocação bacteriana para o fígado foi maior nos animais *Ahr*^{-/-} em relação aos animais WT (Figura 34A). No 5º dia após indução da mucosite intestinal, fragmentos do fígado de animais WT ou *Ahr*^{-/-} também foram cultivados em meios seletivos MacConkey ou Bile esculina, para identificar possíveis táxons bacterianos envolvidos na translocação (Figura 34B e 34C). Em ambos os grupos, foi detectada quantidades semelhantes de UFCs de enterobactérias (Figura 34B). O cultivo em meio sólido Bile esculina revelou um aumento marcante do número de colônias bacterianas somente nos animais *Ahr*^{-/-} tratados com

5-FU, o qual foi significativamente maior em relação aos animais WT que receberam quimioterapia (Figura 34C).

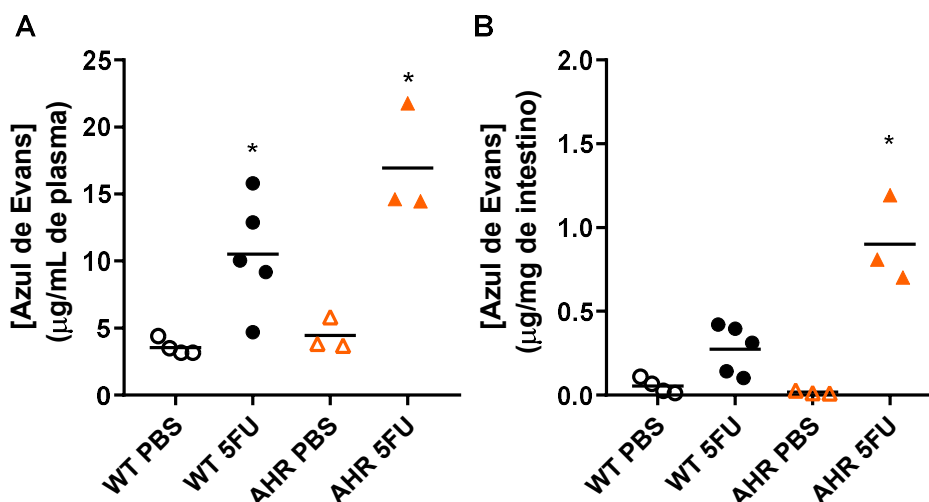


Figura 33- Avaliação da permeabilidade intestinal de animais *Ahr*^{-/-} no quinto dia do protocolo experimental, por meio do ensaio de azul de Evans. A permeabilidade intestinal foi avaliada no plasma (A), em fragmentos do intestino (B) no 5º dia após início do tratamento com 5-FU. 24 horas após os animais receberem uma solução de azul de Evans por via oral. Os resultados estão expressos em média. n= 3-5 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1.

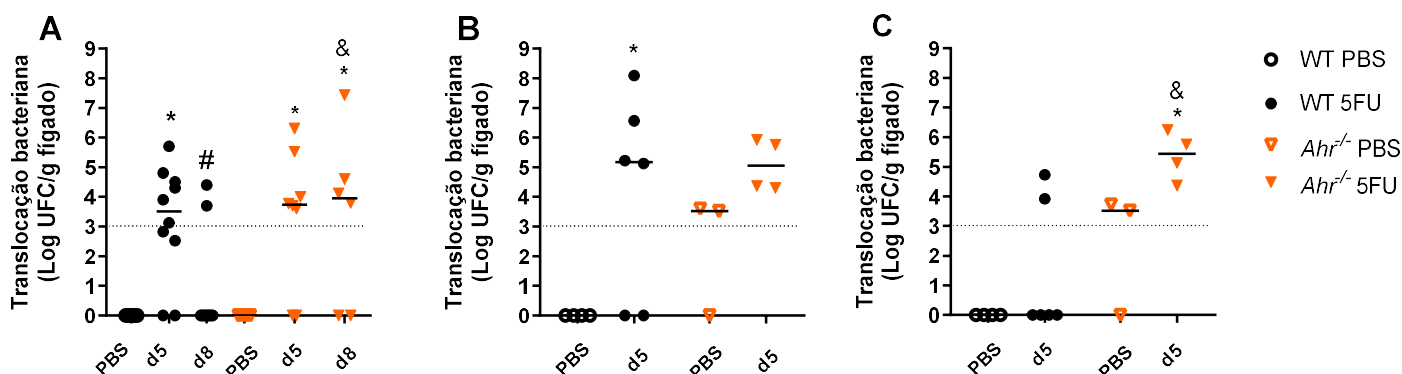


Figura 34- Análise da translocação de bactérias intestinais para o fígado em animais WT ou *Ahr*^{-/-} após tratamento com 5-FU. Fragmentos do fígado de animais WT ou *Ahr*^{-/-} foram cultivados em meio sólido MH, para análise da translocação bacteriana nos dias 5 ou 8 após indução da mucosite intestinal (A). No 5º dia do protocolo experimental, o fígado também foi cultivado nos meios seletivos MacConkey (B) e Bile esculina (C). Os resultados estão expressos em mediana. n= 3-10 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 5 ou &p<0,05 vs. WT. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

Em conjunto, os resultados anteriores sugerem um papel protetor desempenhado pela ativação de AHR durante a quimioterapia com 5-FU. Buscando mais evidências desse papel protetor desempenhado por AHR nesse contexto, buscou-se identificar o efeito da

administração de um potencial ligante de AHR, derivado do metabolismo microbiano de TRP, na mucosite intestinal. Para isso, animais WT foram tratados diariamente com Iald, durante todo protocolo experimental, e acompanhados para a determinação dos parâmetros mostrados na Figura 35. Os animais que receberam Iald ou veículo apresentaram leucopenia, após 5 ou 8 dias do início do tratamento com 5-FU (Figura 35A). A perda de peso corporal foi observada em ambos os grupos tratados com 5-FU durante todos os tempos analisados. No entanto, os animais que receberam Iald mostraram uma menor perda de peso corporal no 3º dia do protocolo experimental (Figura 35B). O aumento do escore clínico foi observado no 5º, 8º e 10º dias após início do tratamento com 5-FU, sendo menor nos animais que receberam Iald em relação aos animais tratados com veículo, no 5º dia do protocolo experimental (Figura 35C). Além disso, a administração de Iald resultou em uma proteção de 100% dos animais quanto à morte induzida pela quimioterapia com 5-FU, ao passo que apenas 20% dos animais tratados com veículo sobreviveram à quimioterapia (Figura 35D).

O próximo passo foi avaliar o efeito do tratamento com Iald sobre os parâmetros histológicos e o infiltrado neutrofílico durante a quimioterapia com 5-FU. O tratamento com Iald não alterou substancialmente a lesão intestinal induzida por 5-FU, em relação àquela observada em animais tratados com veículo (Figura 36A, B). No entanto, a atividade de MPO no tecido do íleo de animais tratados com Iald que receberam quimioterapia foi significativamente menor em relação à dos animais que receberam 5-FU e veículo (Figura 37), no quinto dia do protocolo experimental.

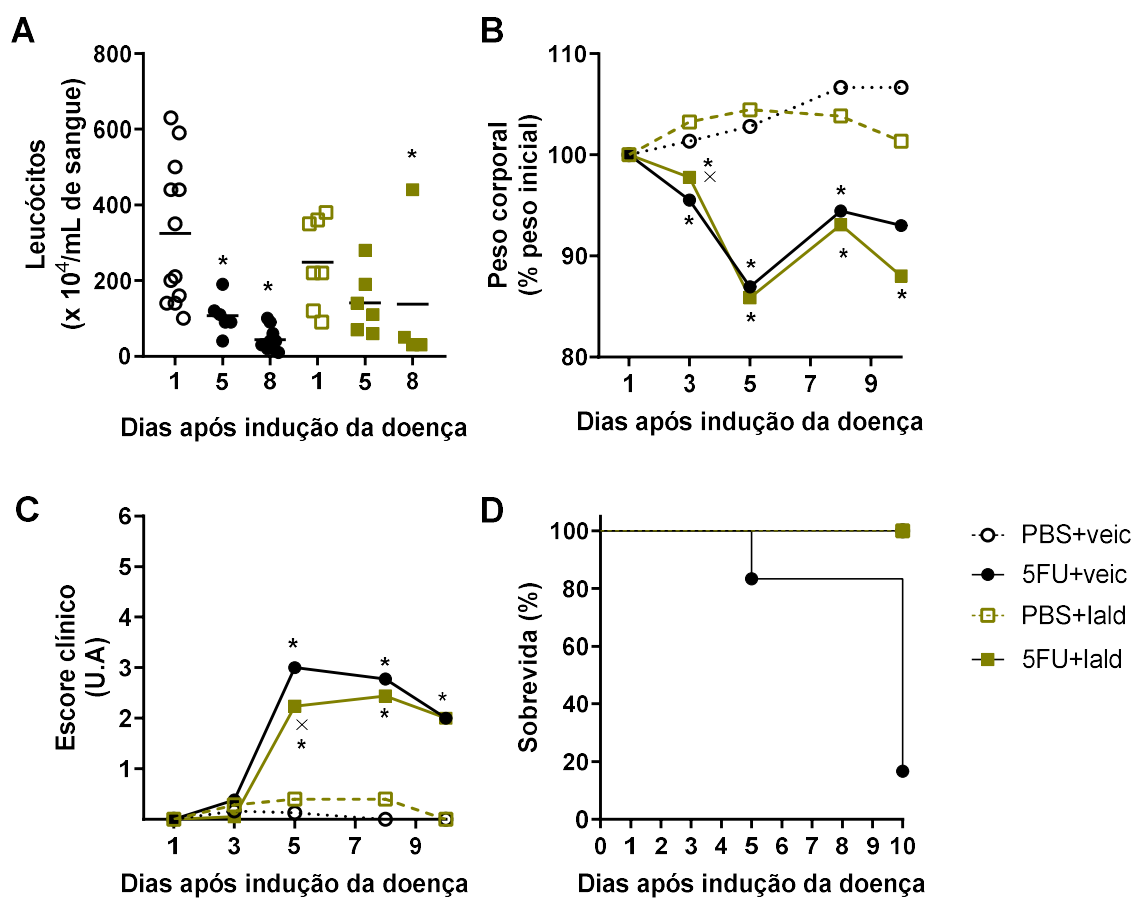


Figura 35- Avaliação do efeito do tratamento com um agonista de AHR nos parâmetros hematológicos, clínicos e na taxa de sobrevida após quimioterapia com 5-FU. Animais WT submetidos à mucosite intestinal foram tratados com Iald durante todo o protocolo experimental, para avaliação da contagem de leucócitos totais no sangue (A), do peso corporal (B), escore clínico (C) e da taxa de sobrevida (D). Os resultados estão expressos em média. $n=3-10$ por grupo. * $p<0,05$ vs. dia 1 ou $x p<0,05$ vs. veículo. U.A: unidades arbitrárias.

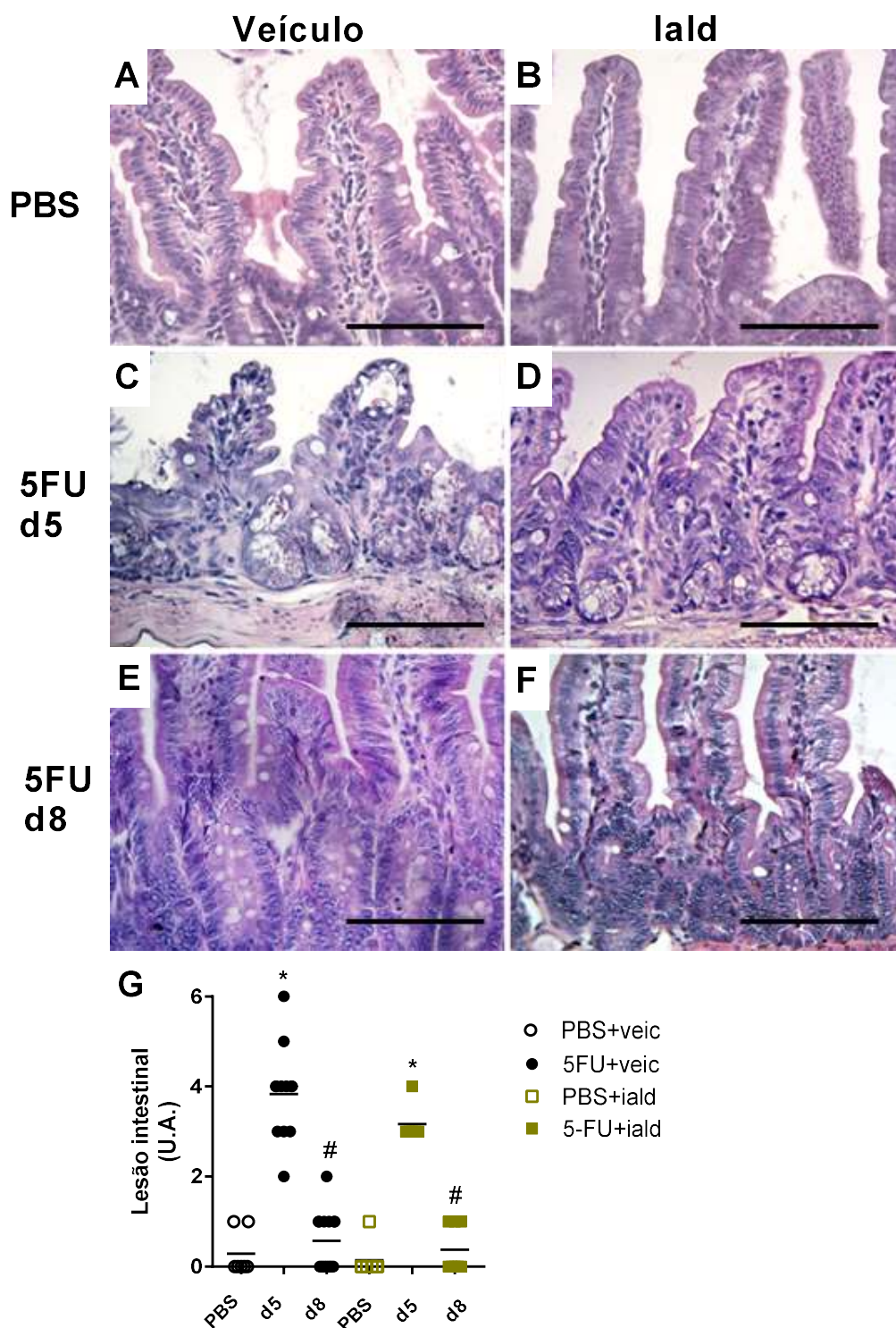


Figura 36- Análise das alterações histopatológicas após o tratamento de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por 5-FU com um agonista de AHR. Animais WT receberam Iald ou veículo durante todo protocolo experimental. Nos tempos indicados na figura, o tecido do íleo foi coletado para análise da lesão intestinal após coloração com H&E, sendo representados pelas imagens obtidas com uma objetiva de 40x (A-F) e os respectivos escores histopatológicos (G). Os resultados estão expressos em média. n= 6-12 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou #p<0,05 vs. dia 5. A barra de escala corresponde a 80µm.

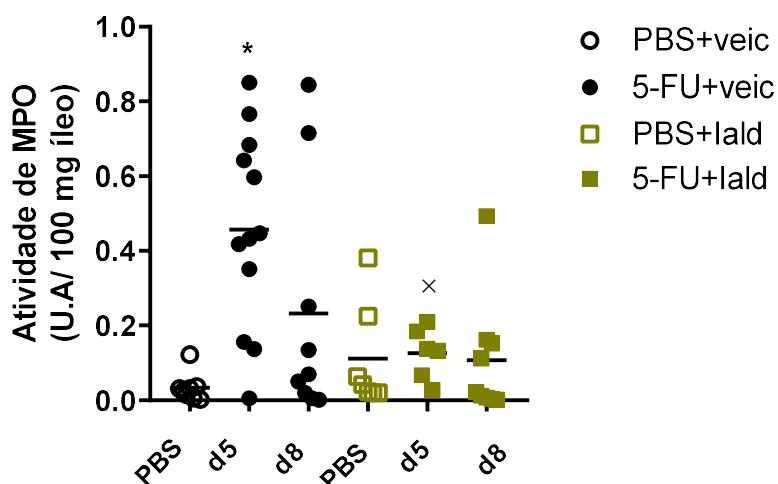


Figura 37- Análise da atividade de MPO após o tratamento com um metabólito de TRP microbiano, em animais WT submetidos à mucosite intestinal. Animais WT receberam Iald ou veículo durante todo protocolo experimental. Nos tempos indicados na figura, o tecido do íleo foi coletado para análise da atividade de MPO. Os resultados estão expressos em média. n= 6-12 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou x p<0,05 vs. veículo. U.A: unidades arbitrárias.

Posteriormente, avaliou-se a permeabilidade intestinal, por meio da determinação da concentração de azul de Evans no plasma e em fragmentos do intestino delgado de animais submetidos à mucosite e tratados ou não com Iald, durante 5 dias (Figura 38). O tratamento com 5-FU levou ao aumento da concentração de azul de Evans no plasma, sendo maior nos animais que receberam 5-FU e Iald em comparação com animais que receberam o quimioterápico e veículo, de forma inesperada (Figura 38A). No intestino delgado, esse aumento foi detectado apenas nos animais que receberam 5-FU e foram tratados com Iald (Figura 38B). Por fim, a translocação de bactérias intestinais para o fígado foi detectada no 5º dia após início do tratamento com 5-FU, apenas no grupo que recebeu veículo, mas não no grupo que recebeu Iald. No 8º dia do protocolo experimental houve detecção de colônias de bactérias no fígado em quantidades semelhantes entre os grupos que receberam quimioterápico, independentemente de receberem ou não o agonista de AHR (Figura 39).

houve alterações da concentração de KYN tanto na circulação e nos tecidos dos animais tratados com 5-FU. Assim, analisou-se a expressão do gene *Ido1* no tecido do íleo, gene que codifica a enzima IDO1, principal envolvida na conversão do TRP a KYN no hospedeiro mamífero. A expressão dessa enzima se mostrou reduzida a partir do 5º dia após indução da mucosite (Figura 40). Para avaliar o papel de IDO1 na produção de KYN durante o protocolo experimental estudado, procedeu-se à quantificação da concentração de KYN e TRP no plasma e íleo de animais *Ido1*^{-/-}. Após a quantificação, a atividade de IDO1 foi determinada pelo cálculo da razão entre a concentração de KYN e de TRP (Figura 41). Embora não tenha havido alteração da atividade de IDO1 nos animais selvagens em ambos os tecidos avaliados após a quimioterapia, tanto no plasma (Figura 41A) quanto no tecido do íleo (Figura 41B), os animais *Ido1*^{-/-} apresentaram redução da razão KYN/TRP em relação aos animais WT, indicando que a conversão de TRP em KYN deve ocorrer, principalmente, pela enzima IDO1.

A atividade de AHR também foi determinada por meio da análise da expressão do gene *Cyp1a1*, que é um gene induzido por AHR, no tecido do íleo de animais WT e *Ido1*^{-/-}. No quinto dia do protocolo experimental da mucosite, não há alteração da expressão desse gene nos animais WT (Figura 42). No entanto, nos animais *Ido1*^{-/-}, há uma redução significativa na expressão de *Cyp1a1*, no dia 5 pós-início do tratamento com 5-FU, sendo consideravelmente menor em relação aos animais WT (Figura 42).

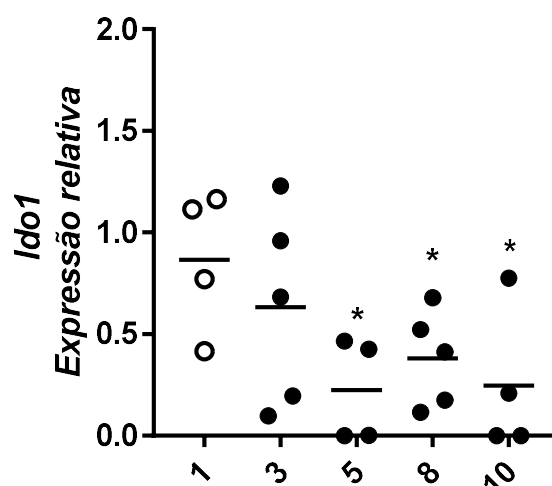


Figura 40- Tratamento com 5-FU altera a expressão do gene *Idol* em camundongos WT. Amostras de íleo foram coletadas após 1, 3, 5, 8 ou 10 dias após início do protocolo experimental para análise da expressão gênica de *Idol* por qPCR. Os resultados estão expressos em média. n= 4-5 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1.

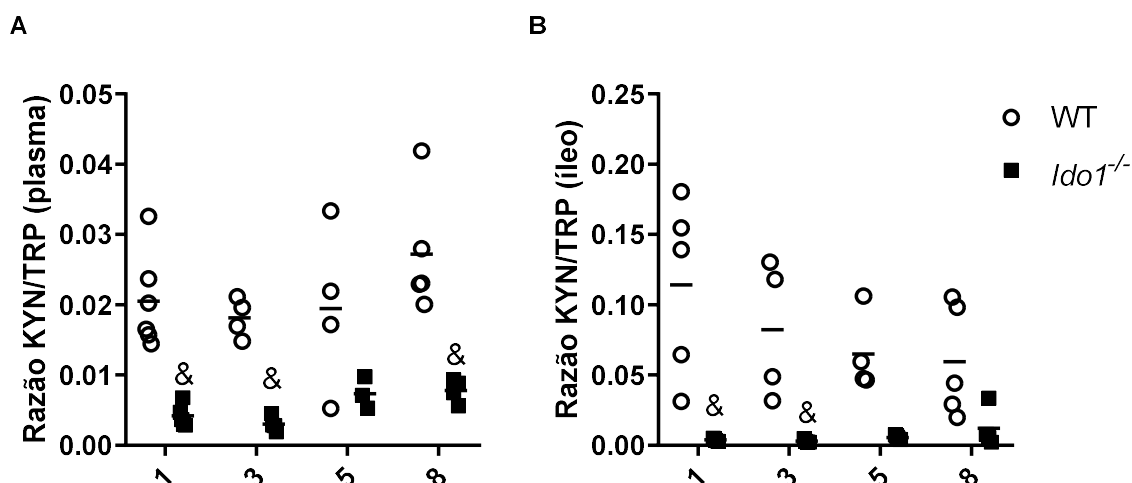


Figura 41- Animais *Idol1*^{-/-} apresentam diminuição da razão KYN/TRP no plasma e no íleo após quimioterapia com 5-FU. O plasma ou fragmentos do íleo de animais WT ou *Idol1*^{-/-} submetidos à indução da mucosite intestinal foram coletados para a determinação da concentração da razão KYN/TRP. n= 4-6 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou & p<0,05 vs. WT.

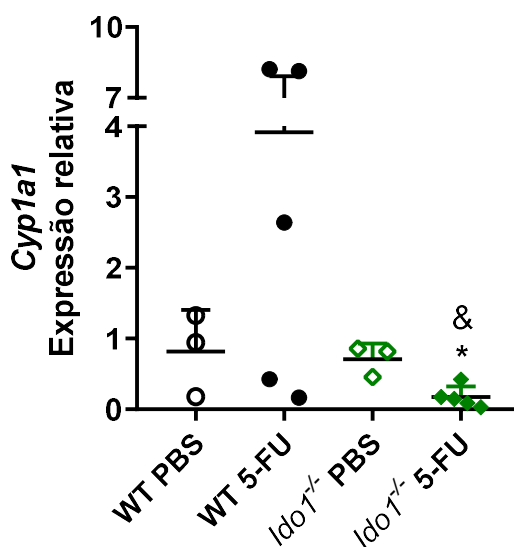


Figura 42- Expressão de *Cyp1a1* no íleo de animais selvagens e *Idol1*^{-/-} após quimioterapia com 5-FU. Amostras de íleo de animais WT ou *Idol1*^{-/-} foram coletadas após 5 dias após início do protocolo experimental para análise da expressão gênica de *Cyp1a1* por qPCR. Os resultados estão expressos em média. n= 3-5 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1.

Então, buscou-se avaliar as alterações induzidas pelo 5-FU em animais *Idol1*^{-/-}. No 8º dia após a indução da mucosite intestinal, os animais *Idol1*^{-/-} apresentaram leucopenia, de forma semelhante aos animais WT (Figura 43A). A perda de peso corporal foi significativa a partir do 3º dia (Figura 43B) e o aumento do escore clínico foi observado a partir do 5º dia (Figura 43C),

sendo maiores no 8º dia em relação aos animais WT para ambos os parâmetros. A taxa de sobrevivência dos animais *Ido1*^{-/-} foi significativamente menor quando comparada a dos animais WT, o que indica a maior susceptibilidade dos animais *Ido1*^{-/-} à mucosite intestinal (Figura 43D).

Apesar da maior susceptibilidade à quimioterapia, a lesão intestinal foi menor nos animais *Ido1*^{-/-} em relação aos animais WT, sendo detectada no 5º dia do protocolo experimental para ambos os grupos (Figura 44). A atividade de MPO no íleo também foi evidenciada no 5º dia após a indução da mucosite, de forma semelhante nos animais WT e nos animais *Ido1*^{-/-} (Figura 45).

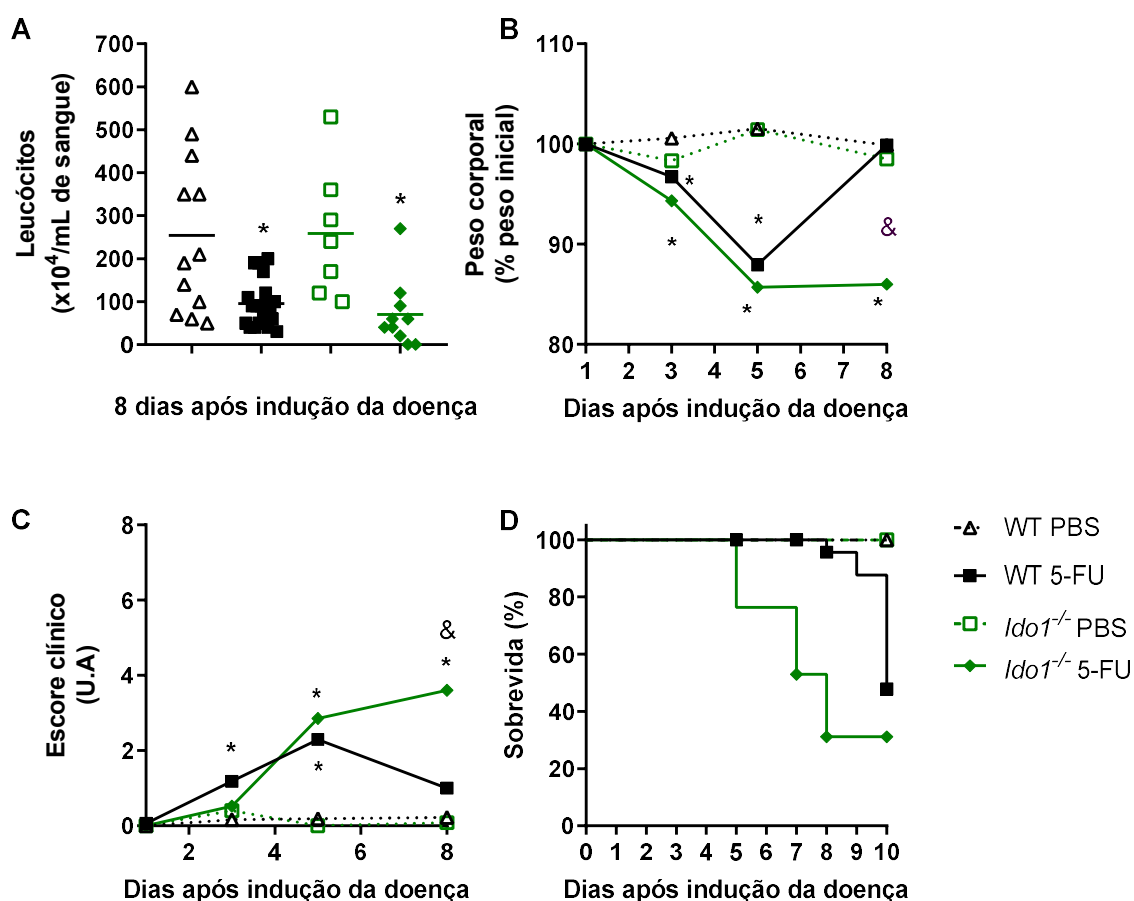


Figura 43- Animais *Ido1*^{-/-} são mais susceptíveis à mucosite intestinal induzida por 5-FU. Animais WT ou *Ido1*^{-/-} foram acompanhados durante 8 dias do protocolo experimental de indução da mucosite intestinal para a determinação da contagem de leucócitos (A), peso corporal (B), escore clínico (C) e taxa de sobrevivência (D). Os resultados estão expressos em média. n= 4-9 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou &p<0,05 vs. WT. U.A.: unidades arbitrárias.

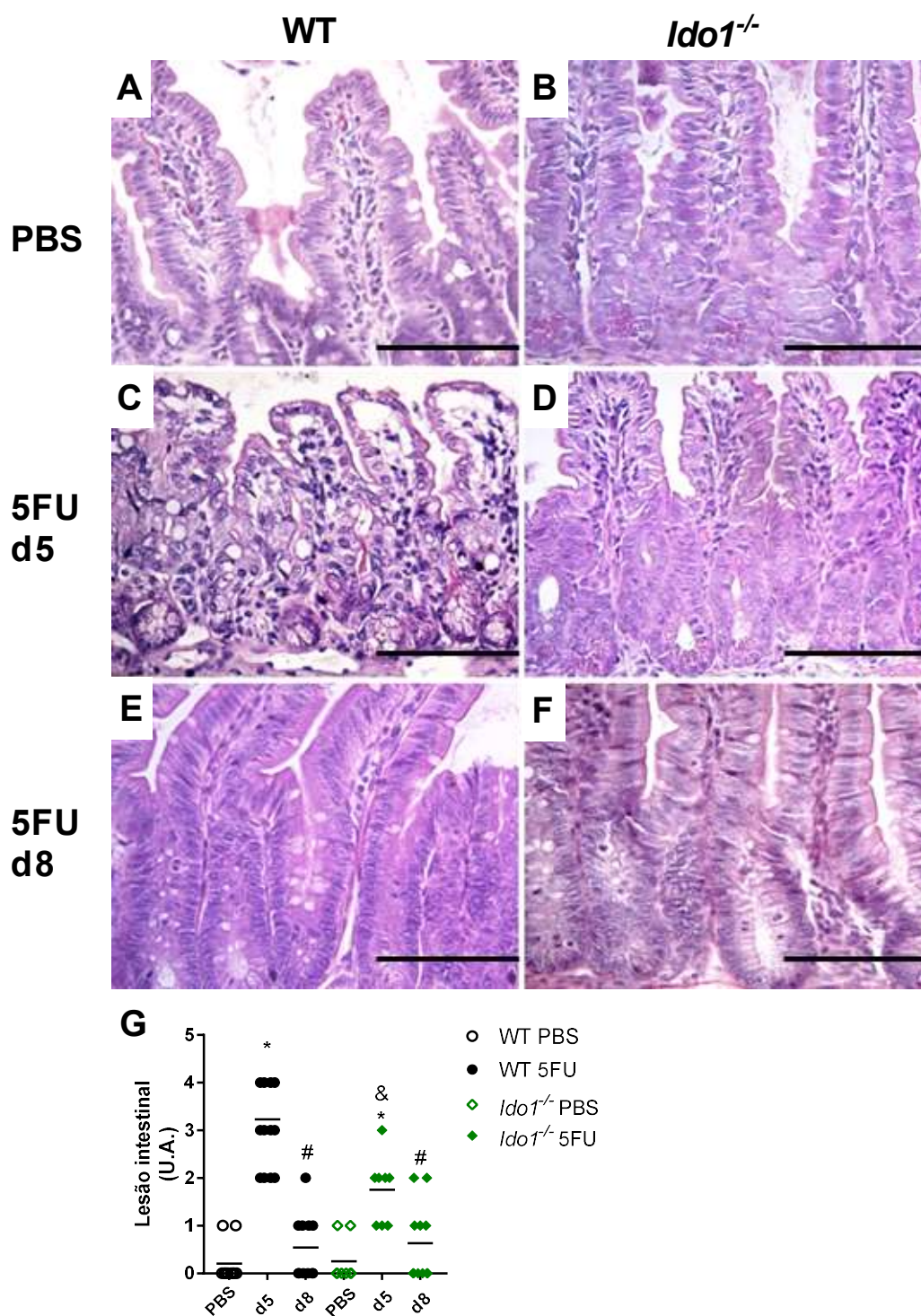


Figura 44- Análise da lesão intestinal no tecido do íleo em animais *Idol1*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal por 5-FU. Após 5 e 8 dias do início da administração de 5-FU, foi realizada a análise histológica no tecido do íleo de animais WT ou de animais *Idol1*^{-/-}. Nos tempos indicados na figura, o tecido do íleo foi coletado para análise da lesão intestinal após coloração com H&E, sendo representados pelas imagens obtidas com uma objetiva de 40x (A-F) e os respectivos escores histopatológicos (G). A barra de escala corresponde a 80 μ m. Os resultados estão expressos em média. n= 3-13 por grupo. *p<0,05 vs. PBS ou #p<0,05 vs. 5-FU-5 dias ou &p<0,05 vs. WT.

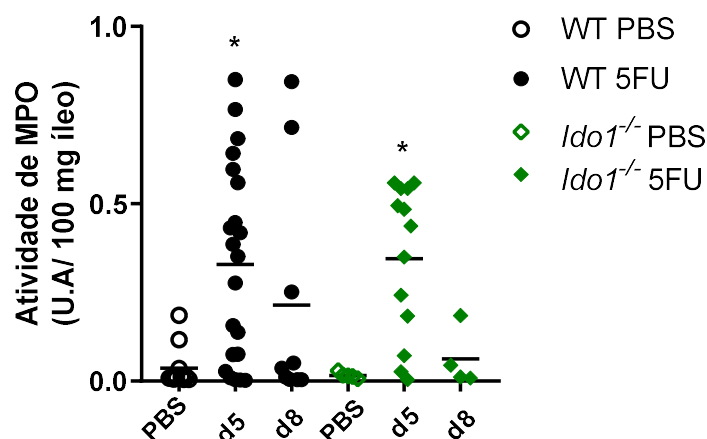


Figura 45- Análise da atividade de MPO no tecido do íleo em animais *Idol1*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal por 5-FU. Após 5 ou 8 dias do início da administração de 5-FU, determinou-se a atividade de MPO no tecido do íleo de animais WT ou de animais *Idol1*^{-/-}. Os resultados estão expressos em média. n= 4-20 por grupo. *p<0,05 vs. PBS. U.A: unidades arbitrárias.

Posteriormente, avaliou-se a permeabilidade intestinal dos animais *Idol1*^{-/-} no 5º dia do protocolo experimental, por meio do ensaio de azul de Evans (Figura 46) e análise da expressão de genes associados à função de barreira do intestino (Figura 47). Observou-se um aumento da concentração de azul de Evans no plasma, tanto de animais WT quanto de animais *Idol1*^{-/-}, sendo significativamente maior nos animais *Idol1*^{-/-} (Figura 46A). No intestino, somente os animais *Idol1*^{-/-} apresentam aumento da concentração do corante (Figura 46B). A expressão do gene *Zo-1* não foi alterada pela quimioterapia em ambos os grupos (Figura 47A). O gene *Ocludina* apresentou expressão reduzida no intestino de animais *Idol1*^{-/-} (Figura 47B) e a expressão de *Claudina-3* mostrou redução no intestino de ambos os animais WT ou *Idol1*^{-/-} após quimioterapia (Figura 47C). Porém, é importante ressaltar que a expressão dos três genes estava reduzida nos animais *Idol1*^{-/-} que receberam PBS em relação aos animais WT controle (Figura 47A-C).

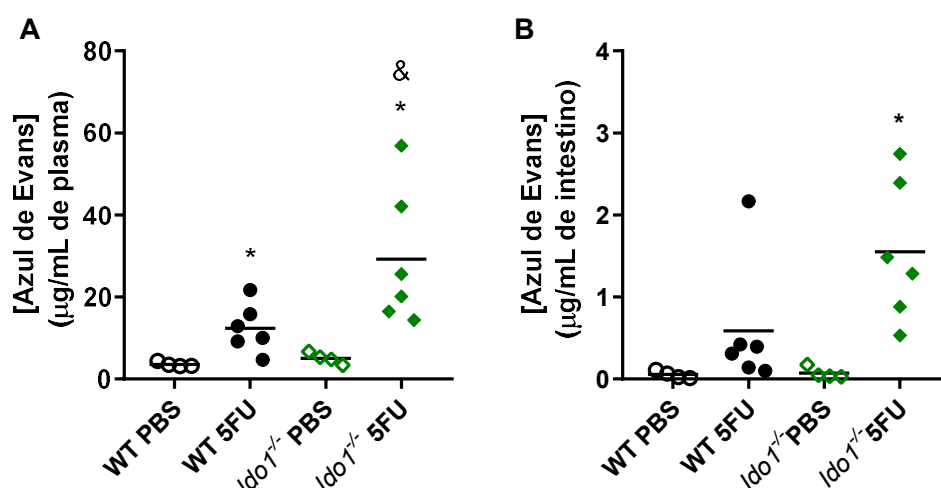


Figura 46- Animais *Idol1*^{-/-} apresentam aumento da permeabilidade intestinal após quimioterapia. Animais WT ou *Idol1*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal por 5-FU foram eutanasiados no 5º dia do protocolo experimental, para a determinação da concentração de azul de Evans em amostras de plasma (A) e intestino delgado (B). Os resultados estão expressos em média. n= 4-6 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou &p<0,05 vs. WT.

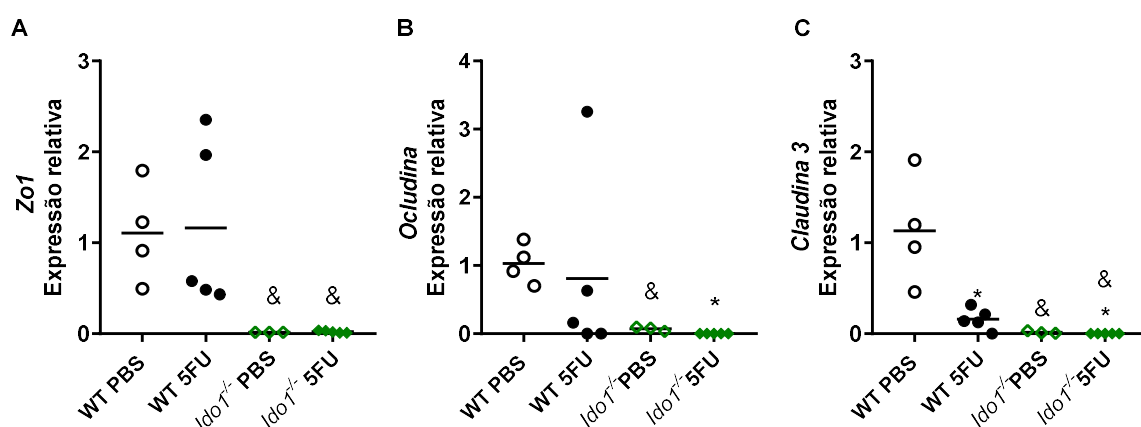


Figura 47- Avaliação da expressão de genes associados à função de barreira intestinal em animais *Idol1*^{-/-} após quimioterapia com 5-FU. A expressão dos genes *Zol1* (A), *Ocludina* (B) e *Claudina 3* (C) foram avaliadas por qPCR no íleo de animais WT ou *Idol1*^{-/-} após 5 dias da indução da mucosite intestinal com 5-FU. Os resultados estão expressos em média. n= 4-6 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1.

Para avaliar se a maior susceptibilidade dos animais *Idol1*^{-/-} seria decorrente de diferenças na translocação microbiana após indução da mucosite, foi realizado o cultivo de extratos de fígado em meios seletivos no quinto dia do protocolo experimental (Figura 48). Embora tenha se detectado uma menor quantidade de UFCs de enterobactérias no fígado de animais *Idol1*^{-/-} que receberam 5-FU em relação à quantidade detectada nos animais WT (Figura 48A), foi observada uma maior quantidade de colônias de cocos Gram-positivo no fígado de animais *Idol1*^{-/-}, em relação ao encontrado nos animais WT tratados com 5-FU (Figura 48B).

Isso indica que há alterações nos grupos microbianos que translocam para a circulação após a quimioterapia entre os dois genótipos.

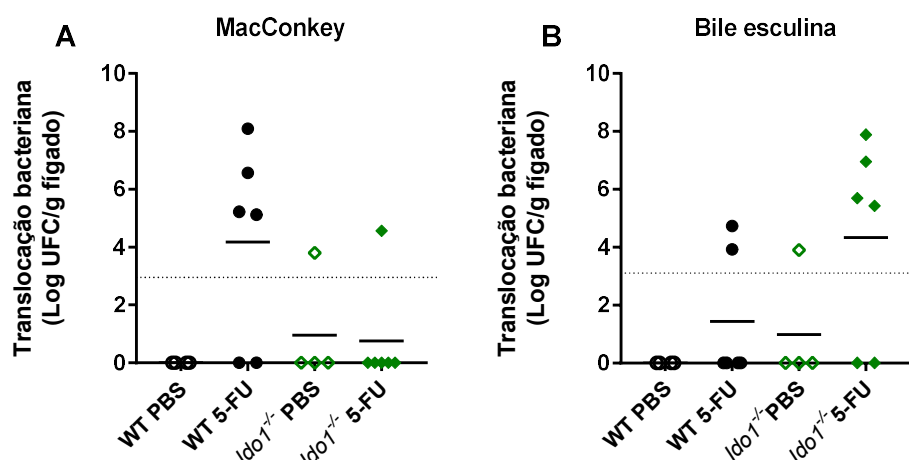


Figura 48- Avaliação da translocação bacteriana em animais *Idol1*^{-/-} após quimioterapia com 5-FU. A quantificação de UFCs de enterobactérias (A) e cocos Gram-positivo (B) foi conduzida por cultivo em meios seletivos dos extratos de fígado coletados no 5º dia do protocolo experimental dos animais WT ou *Idol1*^{-/-} que receberam ou não quimioterapia. Os resultados estão expressos em mediana. n= 4-6 por grupo. *p<0,05 vs. PBS.

Os dados de translocação de grupos bacterianos diferentes entre os dois genótipos sugerem uma diferença no comportamento da microbiota entre os dois genótipos, durante a resposta à quimioterapia. Assim, foi avaliada a composição da microbiota nos diferentes grupos experimentais, por meio de sequenciamento do DNA 16S das fezes de camundongos WT ou *Idol1*^{-/-}, no 8º dia do protocolo experimental (Figura 49 e 50). No nível basal observa-se uma alteração na abundância de alguns táxons bacterianos entre os animais WT e *Idol1*^{-/-}, com uma redução relativa de membros da família Muribaculaceae e Prevotellaceae (Filo Bacteroidota) e de membros da família Suterellaceae (Filo Proteobacteria) e aumento relativo de membros das famílias Bacteroidaceae (Filo Bacteroidota), Helicobacteraceae (Filo Campilobacterota) e Akkermanciaceae (Filo Verrucomicrobia) nos animais *Idol1*^{-/-} que receberam PBS em relação aos animais WT controle (Figura 49A). Os gêneros/espécies reduzidos no grupo *Idol1*^{-/-} PBS em relação ao grupo WT PBS incluíam *Akkermansia muciniphila*, *Alloprevotella* e gêneros desconhecidos das famílias Muribaculaceae e Lachnospiraceae, ao passo que os gêneros/espécies com abundância aumentada incluíam *Helicobacter* e alguns gêneros desconhecidos de *Akkermansia* e da família Muribaculaceae e Lachnospiraceae (Figura 50A). Apesar dessas alterações discretas em abundância de alguns táxons, não houve diferenças de alfa- e beta-diversidade entre os dois genótipos tratados com PBS (Figura 49B-C).

Os animais *Ido1*^{-/-} apresentaram um aumento expressivo do conteúdo de membros da família Bacteroidaceae após a quimioterapia (Figura 49A). Porém, diferentemente do observado para os animais WT (ver figuras 16 e 17), os animais *Ido1*^{-/-} submetidos à mucosite apresentaram um incremento expressivo da abundância de membros das famílias Enterobacteriaceae (Filo Proteobacteria) e Prevotellaceae (Filo Bacteroidota), quando comparado com os animais *Ido1*^{-/-} tratados com PBS. Além disso, houve queda expressiva da abundância de membros das famílias Muribaculaceae, Prevotellaceae e Lachnospiraceae, nos animais *Ido1*^{-/-} submetidos à quimioterapia. Também, diferentemente dos animais WT tratados com 5-FU, houve queda na abundância relativa de membros das famílias Akkermansiaceae e Helicobacteraceae (Figura 49A). Dentre os gêneros reduzidos nos animais *Ido1*^{-/-} após quimioterapia, destacam-se *Akkermansia* e gêneros desconhecidos das famílias Muribaculaceae e Lachnospiraceae (Figura 50B). Por sua vez, os gêneros com abundância relativa aumentada em animais *Ido1*^{-/-}, após tratamento com 5-FU, incluíam *Bacteroides*, *Alloprevotella* e *Escherichia-Shigella* (Figura 50B). Embora não tenha havido alteração da alfa-diversidade entre animais *Ido1*^{-/-} tratados com PBS ou 5-FU (Figura 49B), houve uma estratificação diferente na análise de beta-diversidade entre os dois grupos (Figura 49C), indicando que houve uma alteração estrutural da microbiota após a quimioterapia também nos animais desse genótipo.

Por fim, ao se comparar animais WT e *Ido1*^{-/-} que receberam 5-FU, não foram observadas diferenças estruturais marcantes, seja quanto à alfa-diversidade (Figura 49B) ou quanto a beta-diversidade (Figura 49C). Porém, foi observado um aumento expressivo da abundância relativa de membros das famílias Bacteroidaceae, Prevotellaceae e Enterobacteriaceae (Figura 49A), do gênero *Alloprevotella* e das espécies *Bacteroides sartorii* e *Helicobacter typhionius* (Figura 50C) e uma queda expressiva na abundância relativa de membros das famílias Muribaculaceae, Helicobacteraceae e Lachnospiraceae (Figura 49A), além dos gêneros *Akkermansia*, e das espécies *A. muciniphila*, *B. acidifaciens* e *H. hepaticus* (Figura 50C) entre os grupos *Ido1*^{-/-} e WT tratados com 5-FU.

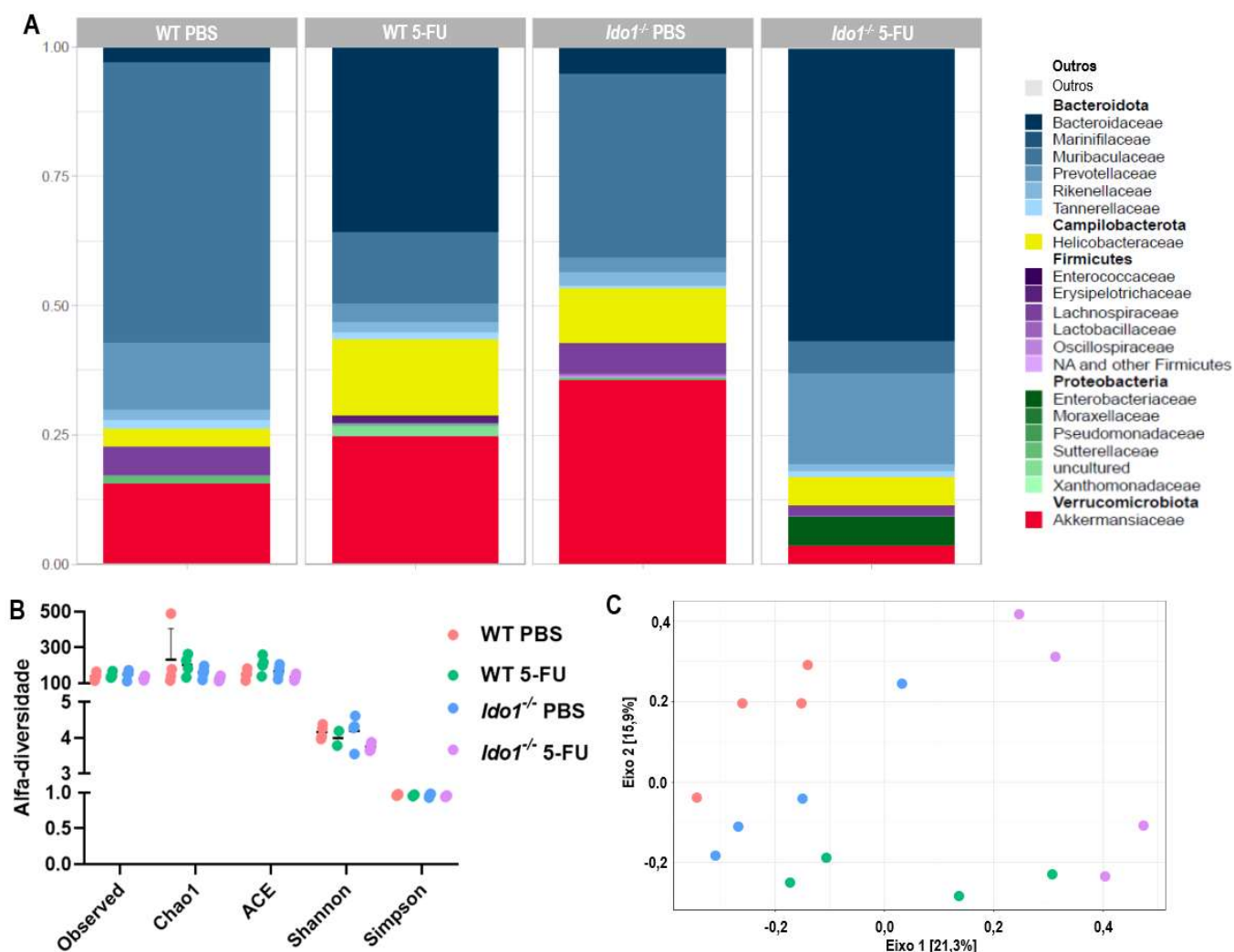


Figura 49- Tratamento com 5-FU leva a alterações na composição da microbiota fecal de camundongos *Ido1*^{-/-} no oitavo dia do protocolo experimental. Fezes de animais WT ou *Ido1*^{-/-} foram coletadas no 8º dia após indução da mucosite intestinal por 5-FU para a análise da microbiota intestinal, por meio do sequenciamento de DNA 16S. Após as análises, foram determinadas a abundância relativa das 5 famílias com maior número de leituras entre os 5 filos mais representados (A), a alfa-diversidade da microbiota, medido por cinco índices diferentes (B) e a beta-diversidade da microbiota, por meio de análise de coordenadas principais (C), nos diversos grupos experimentais.

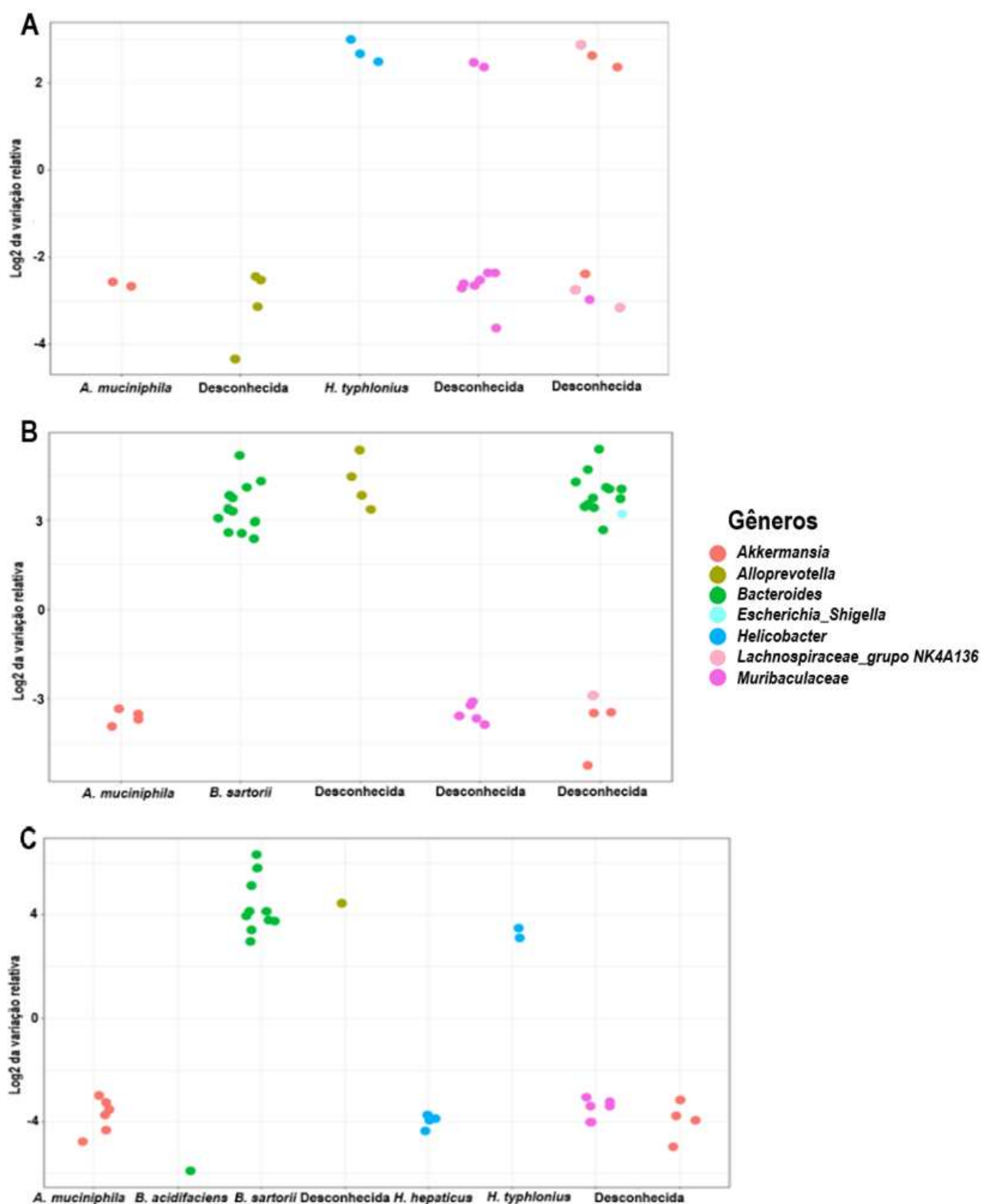


Figura 50- Tratamento com 5-FU leva a alterações de abundância relativa de diferentes espécies bacterianas nos animais *Idol*^{-/-}. Fezes de animais WT ou *Idol*^{-/-} foram coletadas no 8º dia após indução da mucosite intestinal por 5-FU para a análise da microbiota intestinal, por meio do sequenciamento de DNA 16S. Após as análises, foram determinadas a abundância relativa das 5 famílias com leituras passíveis de identificação a nível de gênero. Os resultados estão expressos como log₂ da média da variação relativa entre o grupo *Idol*^{-/-} e grupo WT tratados com PBS (A); entre os grupos *Idol*^{-/-} tratado com PBS e o grupo *Idol*^{-/-} tratado com 5-FU (B) e entre o grupo *Idol*^{-/-} e o grupo WT tratados com 5-FU (C).

Também foram determinadas as concentrações dos metabólitos microbianos de TRP no íleo de animais *Ido1*^{-/-}, durante o curso da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Não há alteração dos níveis de IAA entre ambos os genótipos, nos tempos após quimioterapia avaliados (Figura 51A). A concentração de Iald, porém, estava aumentada no íleo dos animais *Ido1*^{-/-} no 3º dia após início do tratamento com 5-FU, sendo significativamente maior em relação aos animais WT (Figura 51B). Os níveis de I3S não são alterados após o tratamento com 5-FU em nenhum dos genótipos; entretanto, nos animais *Ido1*^{-/-}, a concentração desse metabólito é maior no 5º dia do protocolo experimental, em relação aos animais WT (Figura 51C).

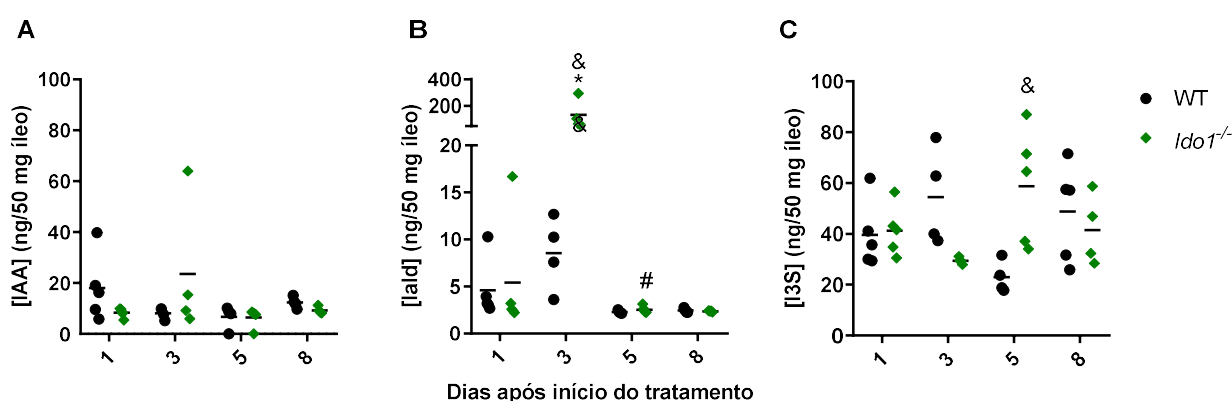


Figura 51- Animais *Ido1*^{-/-} apresentam alteração da concentração de metabólitos microbianos de triptofano após tratamento com 5-FU. A concentração dos metabólitos IAA (A), Iald (B) ou I3S (C) foi determinada, por UPLC-MS/MS, no intestino de animais WT ou *Ido1*^{-/-} submetidos à indução da mucosite intestinal, nos tempos indicados. Os resultados estão expressos em média. n= 4-5 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 e &p<0,05 vs WT.

Após detectar que as alterações na microbiota dos animais *Ido1*^{-/-} induzidas pela quimioterapia são bastante diferentes das alterações observadas nos animais WT tratados com 5-FU, buscou-se avaliar o efeito da exposição dos animais *Ido1*^{-/-} a ampicilina no curso da mucosite intestinal. Todos os grupos analisados mostraram leucopenia no 8º dia após início do tratamento com 5-FU (Figura 52A). Os animais WT apresentaram perda de peso corporal no 5º e 8º dias após indução da mucosite, porém, sem diferença entre os grupos tratados ou não com ampicilina. Nos animais *Ido1*^{-/-} que não receberam ampicilina, a perda de peso induzida pela quimioterapia foi significativamente maior em relação aos animais WT, apenas no 8º dia (Figura 52B). No entanto, o tratamento com ampicilina nos animais *Ido1*^{-/-} promoveu uma maior perda de peso em relação aos animais WT expostos a ampicilina e tratados com 5-FU, no 5º e 8º dias do protocolo experimental (Figura 52B). O escore clínico dos animais WT tratados com veículo aumentou somente no 5º dia após indução da doença. Nos animais *Ido1*^{-/-}, o escore clínico aumentou nos dias 5 e 8 do protocolo experimental, sendo maior em relação aos animais

WT, no 5º dia pós-início da quimioterapia. O tratamento com ampicilina dos animais *Ido1*^{-/-} que receberam 5-FU promoveu o aumento do escore clínico no 3º e 5º dias do protocolo experimental, de forma significativa em relação aos animais *Ido1*^{-/-} tratados com 5-FU e água e aos animais WT que receberam 5-FU e ampicilina (Figura 52C). Essas alterações mais expressivas nos sinais clínicos, causadas pela ampicilina, nos animais *Ido1*^{-/-} que receberam 5-FU, culminaram na falta de proteção contra a mortalidade induzida pela quimioterapia. Ao contrário disso, no grupo WT que recebeu 5-FU e foi exposto a ampicilina houve uma taxa de sobrevida maior em relação aos animais WT que receberam apenas 5-FU (Figura 52D).

O próximo passo foi avaliar o efeito da exposição a ampicilina na translocação bacteriana ocorrida nos animais *Ido1*^{-/-} que receberam quimioterapia. No 8º dia após indução da mucosite intestinal, os fígados dos camundongos dos diversos grupos foram coletados para cultivo em meio Muller-Hinton. Foi observado que o tratamento com ampicilina leva à redução da translocação bacteriana para o fígado nos animais WT com mucosite. Porém, a exposição a ampicilina não interferiu na translocação bacteriana induzida pela quimioterapia em animais *Ido1*^{-/-} (Figura 53).

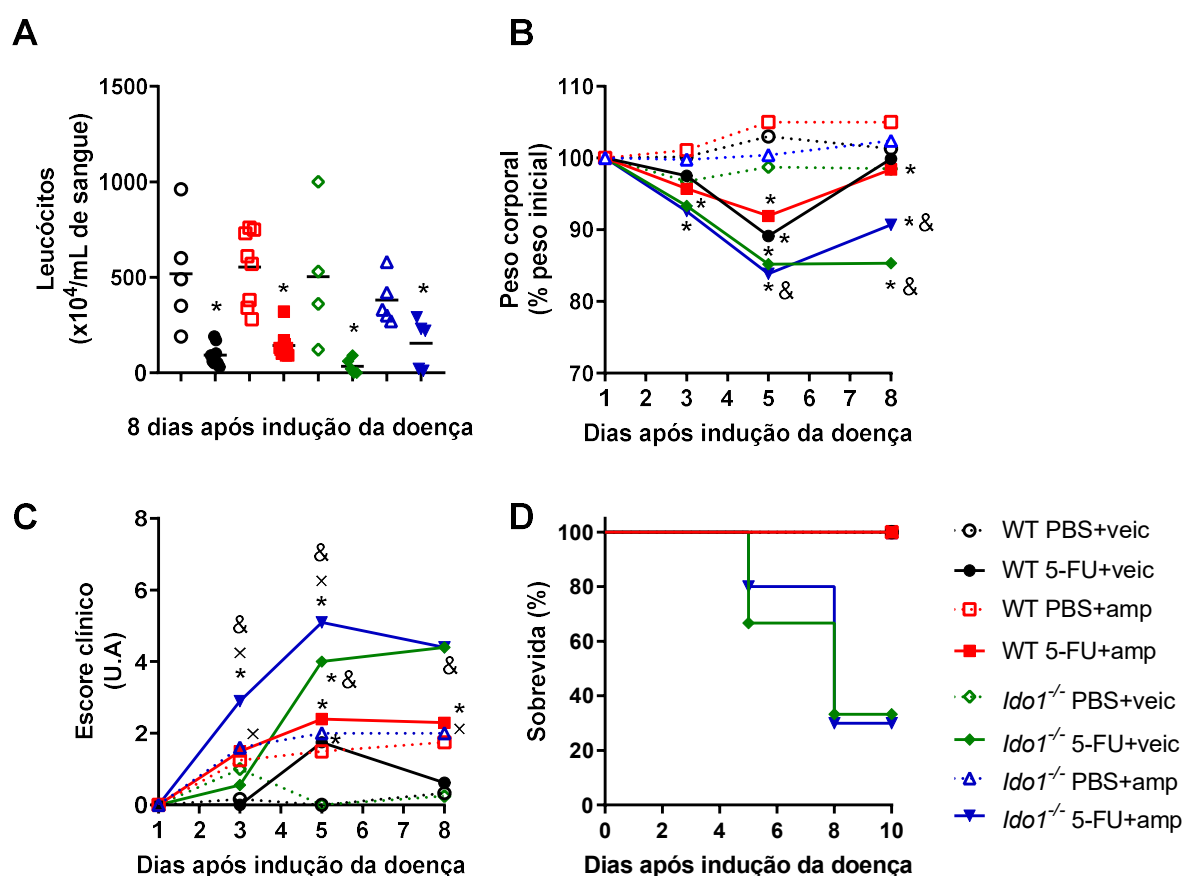


Figura 52- Avaliação de parâmetros hematológicos, clínicos e da taxa de sobrevivência após a exposição a ampicilina de animais WT ou *Ido1*^{-/-} submetidos ao modelo de mucosite intestinal. Animais WT ou *Ido1*^{-/-}, expostos ou não a ampicilina foram acompanhados até o 8º dia do protocolo experimental de quimioterapia com 5-FU para a análise da contagem de leucócitos (A), peso corporal (B), escore clínico (C) e sobrevivência (D). Os resultados estão expressos em média. n= 4-14 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1. & p<0,05 vs. WT 5-FU. x p<0,05 vs. 5-FU+Veículo. U.A: unidades arbitrárias.

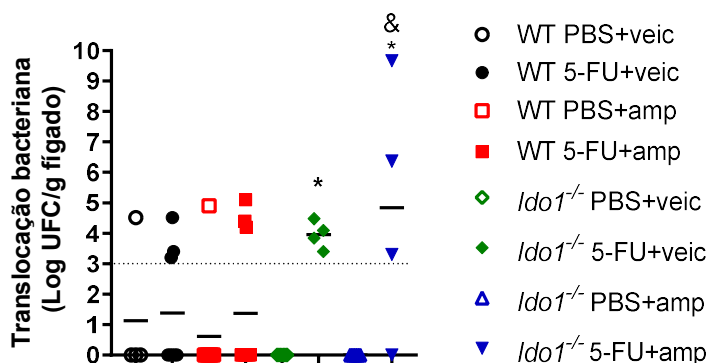


Figura 53- Translocação bacteriana para o fígado após a exposição a ampicilina em animais WT ou *Ido1*^{-/-} submetidos ao modelo de mucosite intestinal. Animais WT ou *Ido1*^{-/-}, expostos ou não a ampicilina, foram eutanasiados no 8º dia do protocolo experimental de quimioterapia com 5-FU para a coleta do fígado para cultivo em meio sólido MH. Os resultados estão expressos em média. n= 4-14 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1. & p<0,05 vs. WT 5-FU. x p<0,05 vs. 5-FU+Veículo. U.A: unidades arbitrárias. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

Capítulo IV – Animais deficientes na expressão de SOCS2, uma proteína induzida por AHR, são mais susceptíveis à quimioterapia com 5-FU.

Após avaliar a susceptibilidade de animais *Ahr*^{-/-} à mucosite intestinal e do papel do metabolismo de TRP durante a quimioterapia, buscou-se analisar o papel da proteína SOCS2, a qual é induzida por AHR, na resposta ao tratamento com 5-FU. A análise da expressão do gene *Socs2*, por qPCR, indicou uma redução da expressão desse gene no tecido do íleo de animais WT, no 5º e 8º dia após indução da mucosite intestinal. No dia 10 do protocolo experimental, em contrapartida, houve um aumento dessa expressão de *Socs2* no intestino dos animais WT que receberam 5-FU (Figura 54A). No 5º dia após início do tratamento com 5-FU, também foi avaliada a expressão de *Socs2* em fragmentos do intestino de animais *Ido1*^{-/-}. Não foi detectada a expressão desse gene nos animais *Ido1*^{-/-}, independentemente do tratamento com 5-FU ou não (Figura 54B).

A fim de se determinar o papel de SOCS2 na resposta ao tratamento com 5-FU, animais *Socs2*^{-/-} foram submetidos ao protocolo de indução da mucosite intestinal por 5-FU para avaliação dos diversos parâmetros induzidos pela doença. A administração de 5-FU promoveu

leucopenia nos animais WT ou *Socs2*^{-/-}, nos tempos avaliados (Figura 55A). Em ambos os grupos, o tratamento com 5-FU promoveu perda de peso corporal, a partir do 3º dia do protocolo experimental, sendo mais expressiva nos animais *Socs2*^{-/-}, no 8º dia após indução da mucosite (Figura 55B). O aumento do escore clínico ocorreu de forma semelhante entre os grupos, no 5º dia do protocolo experimental. No 8º dia, porém, esse aumento foi significativamente maior nos animais *Socs2*^{-/-} em relação aos animais WT (Figura 55C). Essas alterações resultaram em uma marcante taxa de letalidade dos animais *Socs2*^{-/-}, o que evidencia a maior susceptibilidade desses animais à quimioterapia com 5-FU em relação aos animais WT (Figura 55D).

A lesão intestinal induzida pela quimioterapia é significativa no 5º dia após o início do tratamento com 5-FU em ambos os grupos, sendo mais expressiva nos animais *Socs2*^{-/-} em relação aos animais WT. No 8º dia do protocolo experimental, a lesão intestinal permanece elevada apenas nos animais *Socs2*^{-/-} que receberam 5-FU, o que não acontece no grupo WT que recebeu o mesmo tratamento (Figura 56A, B). No entanto, não houve diferença entre os grupos que receberam quimioterápico quanto à atividade de MPO no tecido do íleo, a qual aumenta no dia 5 após indução da mucosite intestinal em ambos os genótipos (Figura 57).

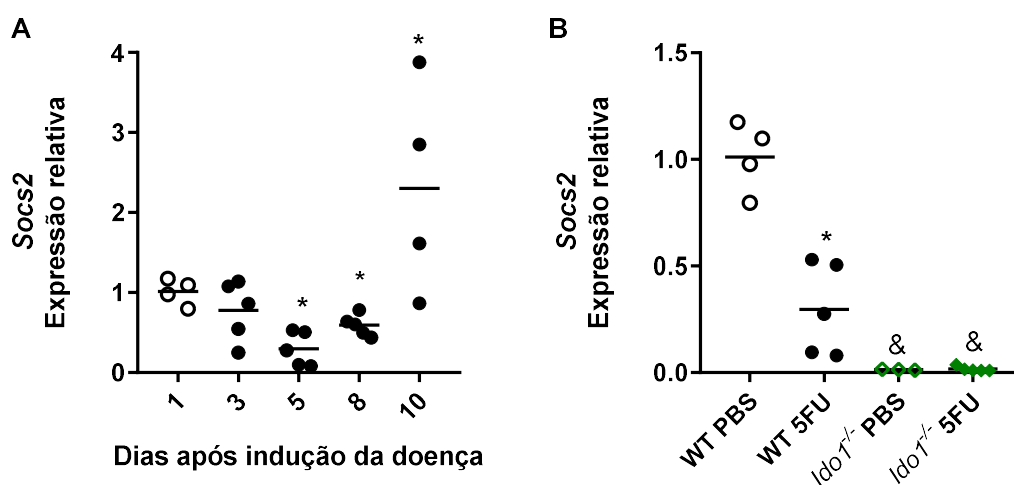


Figura 54- Análise da expressão do gene *Socs2* no tecido do íleo de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por quimioterapia. A expressão do gene *Socs2* foi determinada em fragmentos do íleo de animais WT ao longo do curso da mucosite, por qPCR (A). No 5º dia após início do protocolo experimental, a expressão do gene *Socs2* no íleo foi avaliada em animais WT ou *Ido1*^{-/-} (B). Os resultados estão expressos em média. n= 3-5 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1.

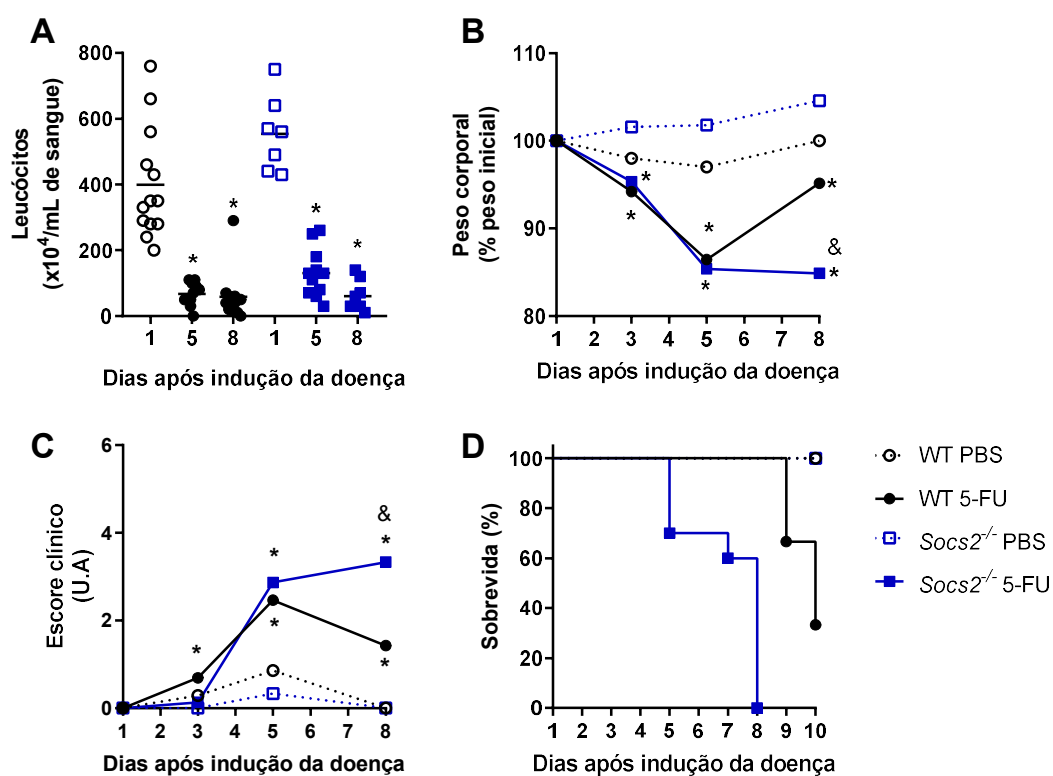


Figura 55- Análise dos parâmetros hematológicos, clínicos e na taxa de sobrevida em animais *Socs2*^{-/-} submetidos ao protocolo de quimioterapia com 5-FU. Animais WT ou *Socs2*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal foram acompanhados para avaliação da contagem de leucócitos totais no sangue (A), do peso corporal (B), escore clínico (C) e da taxa de sobrevida (D). Os resultados estão expressos em média. n= 3-10 por grupo. *p<0,05 vs dia 1 ou &p<0,05 vs. WT. U.A: unidades arbitrárias.

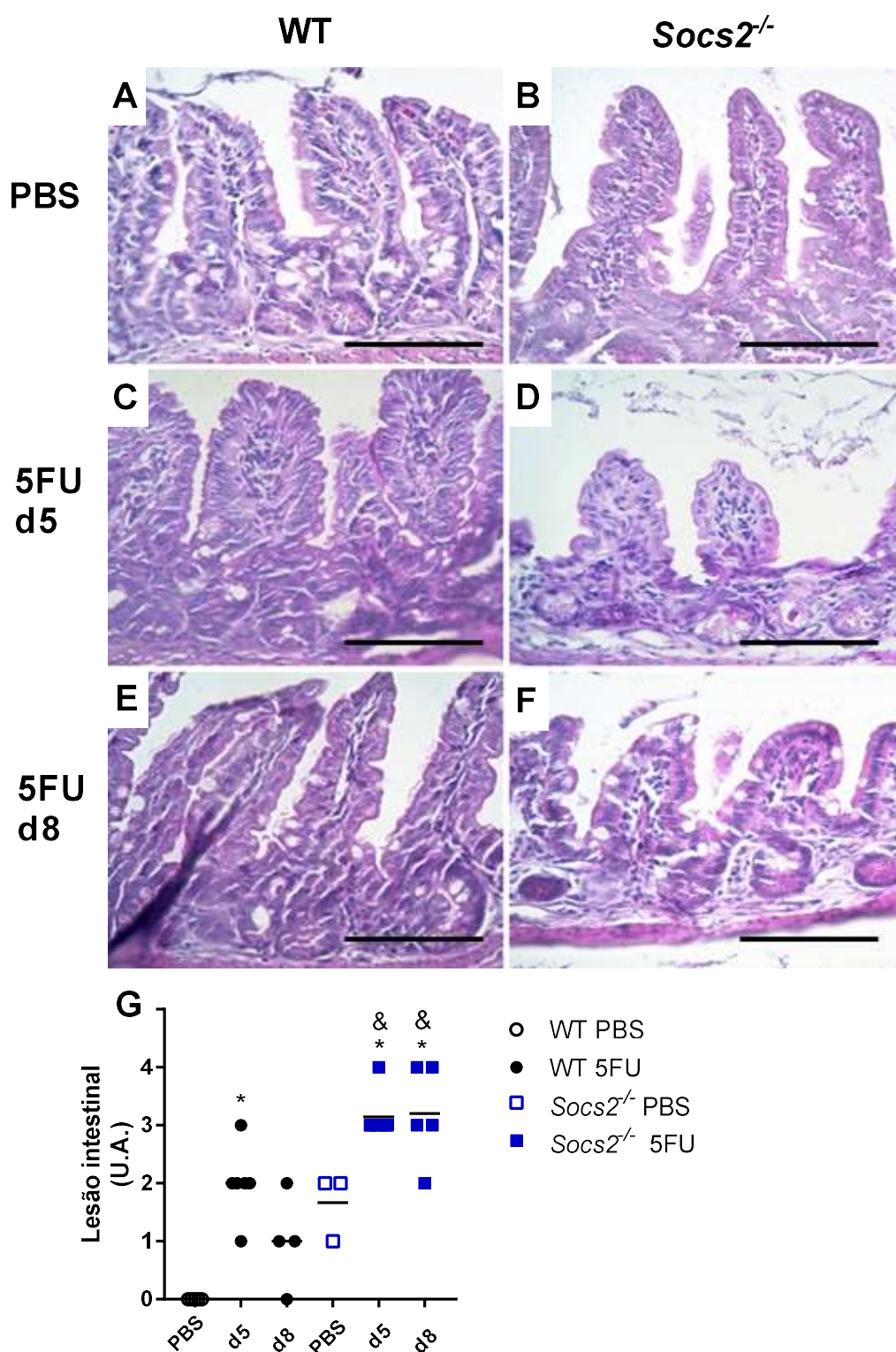


Figura 56- Avaliação da lesão intestinal no intestino em animais *Socs2*^{-/-} após tratamento com 5-FU. Animais WT ou *Socs2*^{-/-} foram submetidos à mucosite intestinal e o tecido do íleo coletado para análise histopatológica. Nos tempos indicados na figura, o tecido do íleo foi coletado para análise da lesão intestinal após coloração com H&E, sendo representados pelas imagens obtidas com uma objetiva de 40x (A-F) e os respectivos escores histopatológicos (G). A barra de escala corresponde a 80 μ m. Os resultados estão expressos em média. n= 3-6 por grupo. *p<0,05 vs. PBS ou #p<0,05 vs. 5-FU-5 dias ou &p<0,05 vs. WT.

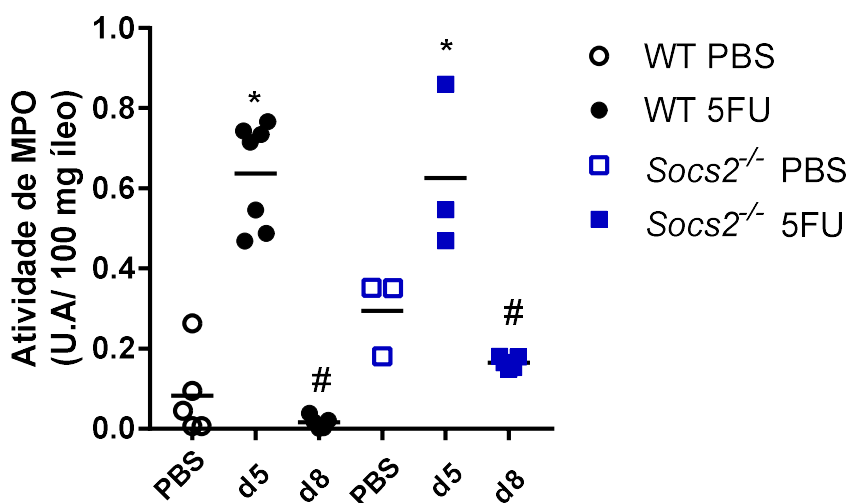


Figura 57- Avaliação da atividade de MPO no intestino em animais *Soccs2*^{-/-} após tratamento com 5-FU. Após 5 ou 8 dias do início da administração de 5-FU, determinou-se a atividade de MPO no tecido do íleo de animais WT ou de animais *Soccs2*^{-/-}. Os resultados estão expressos em média. n= 3-7 por grupo. *p<0,05 vs. PBS. U.A: unidades arbitrárias.

A permeabilidade intestinal foi determinada por meio do ensaio de azul de Evans no plasma e intestino delgado ou fígado de animais WT ou *Soccs2*^{-/-} no 5º dia do protocolo experimental (Figura 58). Houve aumento da concentração de azul de Evans apenas nos animais *Soccs2*^{-/-} que receberam quimioterapia e a concentração do corante foi significativamente maior em relação aos animais WT que receberam 5-FU (Figura 58A). Embora tenha sido detectado um aumento da concentração de azul de Evans no intestino de animais WT que receberam 5-FU, a concentração do corante estava mais elevada nos animais *Soccs2*^{-/-} em relação aos animais WT (Figura 58B).

Outra metodologia empregada para avaliar a permeabilidade intestinal foi a análise da expressão de genes que codificam proteínas de função de barreira (*Zo1*, *Ocludina* e *Claudina 3*), no tecido do íleo de animais WT e *Soccs2*^{-/-} no 5º dia após indução da mucosite intestinal (Figura 59). Os resultados mostraram que a expressão desses genes não foi detectada nos animais *Soccs2*^{-/-}, diferentemente do que ocorre nos animais WT (Figura 59A-C). Dentre os genes analisados, não houve alteração da expressão de *Zo1* ou *Ocludina* nos animais WT tratados com PBS ou 5-FU (Figura 59A, B). No entanto, a expressão de *Claudina 3* diminuiu no grupo WT submetido à mucosite intestinal (Figura 59C).

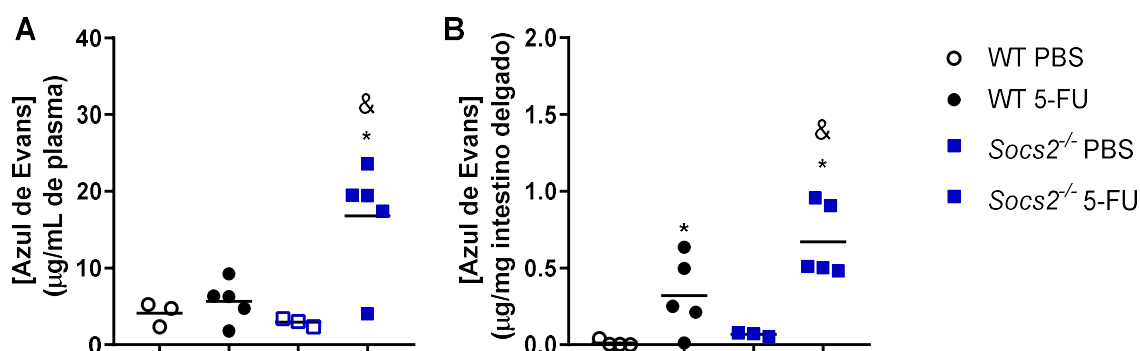


Figura 58- Determinação da concentração de azul de Evans nos tecidos de animais *Socs2*^{-/-} tratados com 5-FU. Animais WT ou *Socs2*^{-/-} submetidos à mucosite intestinal por 5-FU foram eutanasiados no quinto dia do protocolo experimental, para a determinação da concentração de azul de Evans em amostras de plasma (A) e intestino delgado (B). Os resultados estão expressos em média. n= 4-6 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 ou &p<0,05 vs. WT.

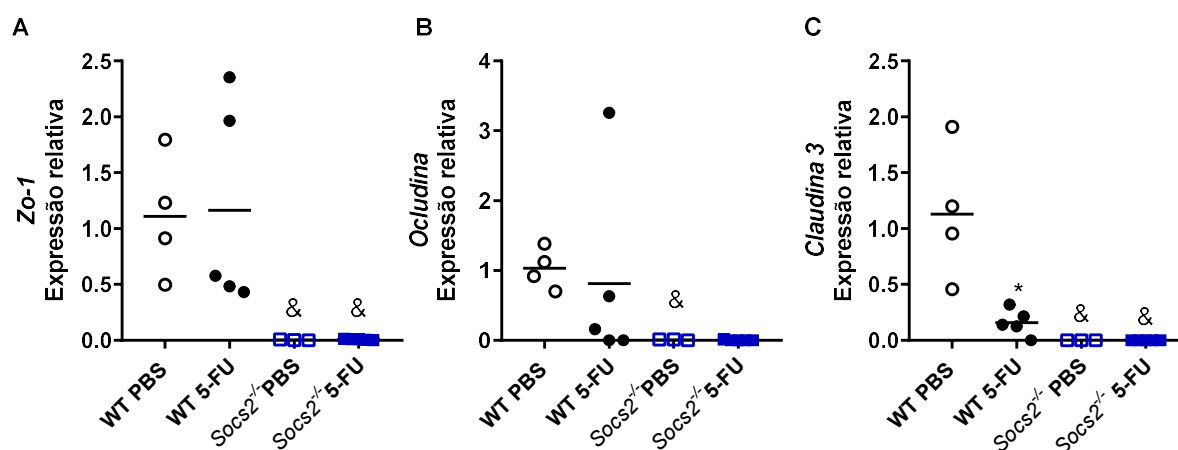


Figura 59- Avaliação da expressão de genes associados à função de barreira intestinal em animais *Socs2*^{-/-} após quimioterapia com 5-FU. A expressão dos genes *Zo1* (A), *Occludina* (B) e *Claudina 3* (C) foram avaliadas por qPCR no íleo de animais WT ou *Socs2*^{-/-} após 5 dias da indução da mucosite intestinal com 5-FU. Os resultados estão expressos em média. n= 4-6 por grupo. *p<0,05 vs. dia 1 e &p<0,05 vs. WT.

Após verificar o aumento da permeabilidade intestinal em animais *Socs2*^{-/-}, buscou-se avaliar se isso resultaria em maior translocação bacteriana para o fígado desses animais. Foi observada uma translocação significativa apenas nos animais *Socs2*^{-/-}, no 8º dia após início do tratamento com 5-FU, sendo maior em relação aos animais WT, tanto no meio sólido MH quanto nos meios seletivos Bile esculina ou MacConkey (Figura 60A-C). Em conjunto, esses resultados mostram que SOCS2 é relevante para atenuar a lesão do epitélio do intestino, a permeabilidade intestinal, a função de barreira e para conter a translocação bacteriana.

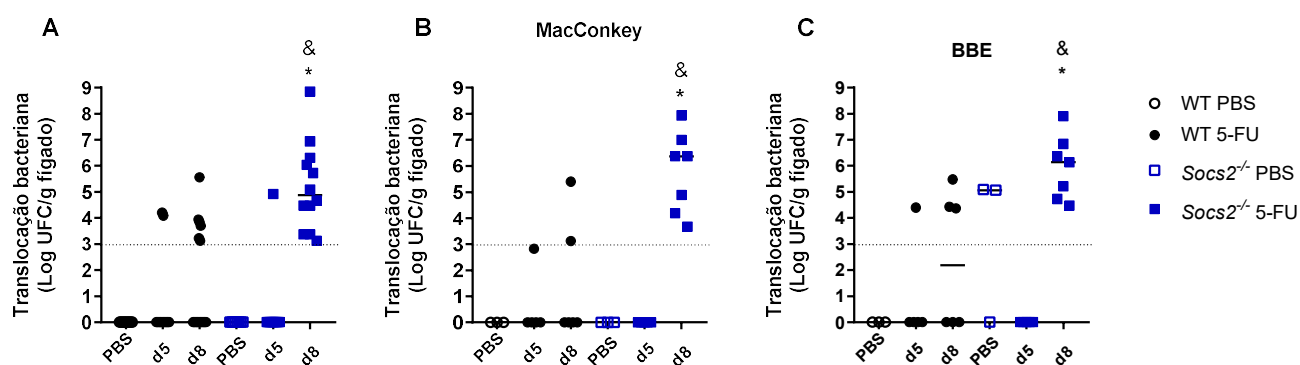


Figura 60- Avaliação da translocação bacteriana em animais *Socs2*^{-/-} após quimioterapia com 5-FU. A quantificação de UFCs de bactérias totais (A) enterobactérias (B) e cocos Gram-positivo (C) foi conduzida por cultivo em meios sólidos dos extratos de fígado coletados no quinto dia do protocolo experimental dos animais WT ou *Socs2*^{-/-} que receberam ou não quimioterapia. Os resultados estão expressos em mediana. n= 3-11 por grupo. *p<0,05 vs. PBS e & p<0,05 vs. WT.

6 DISCUSSÃO

O desenvolvimento da mucosite intestinal causada por 5-FU, em pacientes, ocorre, em geral, após dois dias do início da quimioterapia (Sonis, 2004). Assim, o modelo desenvolvido nesse trabalho simula algumas das alterações encontradas em pacientes, guardando paralelos temporais com a doença humana. No nosso modelo de mucosite intestinal, geralmente, as alterações clínicas foram mais evidentes no 5º e 8º dias do protocolo experimental e os parâmetros histopatológicos, inflamatórios, de permeabilidade intestinal e função de barreira apresentam o pico no 5º dia após indução da doença. A disbiose e a translocação bacteriana foram mais comumente detectadas no 8º dia. No entanto, pode haver variação entre os experimentos ou entre os animais do mesmo grupo, principalmente em relação ao 8º dia do protocolo experimental, em que alguns animais podem não ter se recuperado da doença. Uma vez que as alterações mais expressivas da doença ocorreram no 5º ou 8º dia após indução da mucosite, foram definidos esses tempos experimentais para realização das análises descritas, nas etapas seguintes.

Na caracterização temporal da mucosite, em relação à análise histopatológica, alguns animais ainda apresentaram lesão tecidual no 8º dia da doença. Porém, geralmente, a lesão era revertida nesse tempo experimental. Nesse modelo de mucosite, as alterações histopatológicas consistiram na presença de infiltrado inflamatório, diminuição do comprimento e edema das vilosidades. Acompanhada do aumento dessa lesão no íleo, no dia 5 da doença, houve aumento da atividade de MPO, sugestiva do infiltrado de neutrófilos. Contudo, não houve diferença em relação às concentrações de citocinas no intestino, após o tratamento com 5-FU, como frequentemente observado em outros estudos (Li HL et al., 2017; Wu CH et al., 2019; Qu et al., 2020). No entanto, ainda não foram determinadas as concentrações dessas citocinas no intestino ou plasma dos animais *Ahr*^{-/-}, *Ido1*^{-/-} ou *Socs2*^{-/-}.

Concomitante às alterações histopatológicas e à atividade de MPO aumentada, houve aumento da permeabilidade intestinal no 5º dia após indução da mucosite, evidenciada pela maior concentração de azul de Evans no plasma e no intestino e pela redução da expressão de *Claudina-3*. A metodologia do azul de Evans é baseada na ligação desse corante a proteínas, após a administração por gavagem oral. Com o aumento da permeabilidade intestinal, ocorre o extravasamento dessas proteínas ligadas ao azul de Evans para o sangue. A manutenção da função de barreira está intimamente relacionada a proteínas das zonas de oclusão, como ZO-1, Ocludina e Claudinas. Durante a inflamação, pode ocorrer a alteração da expressão dessas

proteínas, o que resulta no comprometimento da homeostase intestinal (Garcia-Hernandez et al., 2017). Consistente com outros estudos de lesão intestinal induzida por irradiação ou após indução de sepse observa-se a redução da expressão do gene *Claudina-3* (Shim et al., 2015). Após a sepse ou mucosite intestinal induzida por 5-FU, houve redução da expressão de *Zo-1* ou *Ocludina* (Zheng et al., 2023). No entanto, no nosso modelo de mucosite não houve diferença na expressão desses genes.

De forma secundária ao comprometimento da integridade do epitélio, houve disbiose, concomitante à translocação bacteriana para o fígado, no 8º dia do protocolo experimental. Isso foi consistente com o modelo de lesão intestinal após irradiação, em que se observou redução da expressão de *Claudina-3* e translocação bacteriana (Shim et al., 2015). A disbiose é definida como alteração da composição e função metabólica da microbiota, que pode contribuir para o desenvolvimento e agravamento da mucosite (Montassier et al., 2015; Li HL et al., 2017). Em relação à análise de UFCs nos meios de cultivo empregados, a disbiose foi caracterizada pelo aumento do conteúdo de enterobactérias, enterococos ou estreptococos grupo D e bactérias ácido-láticas. A expansão do conteúdo de enterobactérias, por exemplo, está associada à maior gravidade da mucosite intestinal (Menezes-Garcia et al., 2020). Dentre esses táxons com conteúdo aumentado nas fezes, apenas as bactérias ácido-láticas não foram detectadas no fígado.

Ainda, foi realizado o sequenciamento do DNA 16S nas fezes de animais, também no 8º dia após início do tratamento com 5-FU. Apesar de não haver diferença em relação à alfa-diversidade, observou-se uma segregação entre os grupos de animais tratados com PBS ou 5-FU na análise de coordenadas principais, sugerindo que houve diferenças na composição da microbiota desses grupos. Houve uma redução das famílias Muribaculaceae e Prevotellaceae, pertencente ao filo Bacteroidota, e da família Lachnospiraceae, pertencente ao filo Firmicutes. Alguns membros desses filos estão envolvidos na síntese de SCFA, como o butirato (Chen Y et al., 2022; Dong et al., 2023). A diminuição de Muribaculaceae e Prevotellaceae, promovida pela colonização por *Clostridioides difficile*, também foi associada ao agravamento da colite (Dong et al., 2023), assim como a redução de Muribaculaceae e Lachnospiraceae (Meng et al., 2022). No entanto, o aumento do conteúdo de *Prevotella copri*, do filo Bacteroidota, resultou no agravamento da mucosite intestinal induzida por carboplatina (Yu et al., 2019). Além disso, a maior abundância de Muribaculaceae resultou na toxicidade hematopoiética após a exposição ao benzeno, sendo correlacionada ao metabolismo de TRP e de butirato. A abundância dessa

família também foi associada à diminuição da espessura da camada de muco e ao aumento da permeabilidade intestinal (Xia et al., 2022; Wang J et al., 2023).

Outras alterações promovidas pelo 5-FU envolveram o aumento relativo do conteúdo de membros de uma família não identificada de Proteobacteria e da família Helicobacteraceae, do filo Campilobacterota, as quais estão associadas à inflamação e agravamento de doenças, como colite e enterocolite necrotizante, no caso de *Helicobacter hepaticus*, que também apresentou aumento no presente modelo de mucosite (Dvorak et al., 2013; Mo et al., 2022). Também houve aumento da família Enterococcaceae, do filo Firmicutes, Bacteroidaceae, do filo Bacteroidota, incluindo espécies desconhecidas do gênero *Bacteroides* e de Akkermansiaceae, do filo Verrucomicrobiota, incluindo *Akkermansia muciniphila*. Essas bactérias apresentam papel protetor na manutenção da integridade do epitélio intestinal, melhorando a lesão e a função de barreira, além de sintetizar metabólitos, como SCFA, regular a produção de citocinas e modular a microbiota (Choi et al., 2019; Wang C et al., 2021; Ling et al., 2022; Wu Z et al., 2022). Assim, o aumento dessas bactérias no 8º dia após indução da mucosite pode ter contribuído para o controle da lesão e recuperação da barreira epitelial. Além disso, os resultados mostrados anteriormente da determinação de UFCs nas fezes dos animais tratados com 5-FU foram consistentes com parte dos resultados do sequenciamento, que também evidenciaram aumento de Proteobacteria e Enterococcaceae.

Em conjunto, essas alterações causadas pelo 5-FU foram consistentes com outros modelos de mucosite intestinal induzida por quimioterápico (Kato et al., 2017; Sougiannis et al., 2019). Conforme exposto anteriormente, a disbiose pode contribuir para o agravamento da mucosite. Então, o controle da disbiose constitui uma estratégia interessante, que tem sido abordada em diversos estudos, para atenuar a inflamação e a lesão intestinal causadas pela quimioterapia (De Jesus et al., 2019; Wang C et al., 2022). Dentre as alternativas propostas na literatura para reverter a disbiose estão o uso de probióticos e antimicrobianos (Pedroso et al., 2015; Hamouda et al., 2017).

Para avaliar se o tratamento com ampicilina poderia promover uma melhora da doença, por meio da redução da translocação bacteriana, foi administrada ampicilina aos animais tratados com 5-FU. O tratamento com esse antimicrobiano promoveu uma redução do conteúdo de bactérias nas fezes de animais submetidos à mucosite intestinal, o que resultou na diminuição da translocação bacteriana para o fígado, no 8º dia do protocolo experimental. Além disso, houve melhora no peso corporal no 10º dia, maior taxa de sobrevivência e o aumento da atividade de MPO foi mais discreto em relação aos animais que não receberam ampicilina. Hamouda et

al. mostraram que a coadministração dos antimicrobianos ampicilina (amplo espectro) e aztreonam (Gram-negativo) melhorou a mucosite intestinal, além de reduzir a inflamação (Hamouda et al., 2017). Menezes-Garcia e colaboradores (2020) também demonstraram que a administração de ciprofloxacino (amplo espectro) protege da mucosite intestinal induzida por 5-FU. Os demais parâmetros de escore clínico e lesão tecidual não apresentaram diferença significativa. Os tratamentos com outros antimicrobianos (ciprofloxacino ou vancomicina) apresentaram resultados semelhantes aos observados para a ampicilina (dados não mostrados). Em conjunto, os resultados discutidos até aqui sugerem que a quimioterapia com 5-FU leva a inflamação intestinal, com comprometimento da função de barreira do epitélio intestinal e alterações da microbiota que culminam na translocação microbiana e morte, e que a terapia antimicrobiana tem potencial de impedir tal translocação, protegendo o hospedeiro da letalidade induzida pela quimioterapia.

Após a caracterização dos parâmetros associados à mucosite, buscou-se avaliar o papel do metabolismo de TRP e a atividade de AHR após indução da doença. A atividade de AHR foi avaliada por meio da condução do modelo experimental de quimioterapia com 5-FU em animais *LacZ^{XRE}*, repórteres para a ativação desse receptor. O gene *LacZ* foi clonado num elemento sob controle da região promotora do AHR que, ao ser ativado, induz a expressão dos genes alvo de AHR e também dos produtos do *LacZ^{XRE}* (Griffith e Wolf Jr, 2001; Shen X et al., 2017). Como a β -galactosidase é a proteína codificada pelo *LacZ*, sua atividade foi determinada a partir da utilização do substrato ONPG. A clivagem desse substrato pela enzima produz um composto amarelado, cuja absorbância foi determinada e é proporcional à atividade da enzima e, portanto, da ativação de AHR (Griffith e Wolf Jr, 2001). Já a dosagem dos metabólitos de TRP se deu por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas. Com essas duas análises em distintos momentos pós-quimioterapia, buscamos determinar se haveria coincidência na alteração das concentrações de metabólitos de TRP e da atividade de AHR.

Pelos resultados obtidos, o tratamento com 5-FU induziu aumento da concentração de KYN e de Iald no plasma, no dia 3 do protocolo experimental. Concomitante a esse aumento, houve maior atividade de AHR no fígado. No intestino, a redução da atividade de AHR foi simultânea à diminuição dos níveis de metabólitos microbianos de TRP (IAA e Iald), no 5º dia do protocolo experimental. Em indivíduos obesos, também foi observado uma menor concentração plasmática dos metabólitos IAA, ILA e IPA e do I3S (metabólito derivado de indol, sintetizado no fígado a partir de indóis livres), os quais foram correlacionados

negativamente com a inflamação (Cussotto et al., 2020). A atividade de AHR também foi avaliada a partir da expressão dos genes *Cyp1a1* e de *Socs2* no intestino de animais WT. Embora não tenhamos encontrado diferenças na expressão de *Cyp1a1*, a expressão de *Socs2* se mostrou reduzida no intestino dos animais submetidos à quimioterapia de maneira concomitante à redução da detecção dos metabólitos de TRP. Assim, mudanças da concentração de metabólitos de TRP pós-quimioterapia com 5-FU nos diferentes tecidos do hospedeiro coincidiram com alterações da atividade de AHR nos respectivos sítios anatômicos, sugerindo que a ativação de AHR foi influenciada pelo metabolismo de TRP no contexto estudado.

Após determinar alteração na atividade de AHR durante o curso da mucosite, avaliou-se a susceptibilidade de animais *Ahr*^{-/-}. Os animais *Ahr*^{-/-} apresentaram alterações clínicas pronunciadas no 3º e 5º dias após indução da doença, que culminaram na maior letalidade desses animais em relação aos animais WT. Além disso, no 5º dia do protocolo experimental, os animais *Ahr*^{-/-} apresentaram lesão intestinal discretamente aumentada em relação aos animais WT, simultânea ao aumento de permeabilidade intestinal e da translocação bacteriana observada no meio sólido Bile esculina. A concentração de azul de Evans, indicativa da permeabilidade intestinal, foi significativamente maior em relação aos animais WT apenas no intestino. Porém, no plasma os níveis desse corante também estavam aumentados de forma semelhante aos animais WT. Os animais WT também apresentaram aumento da permeabilidade intestinal, seguida do aumento da lesão tecidual, bem como da translocação bacteriana, detectada nos meios MH e MacConkey de forma semelhante aos animais *Ahr*^{-/-}. A translocação bacteriana detectada no meio MH também foi maior nos animais *Ahr*^{-/-}, no 8º dia do protocolo experimental, em relação aos animais WT. Em conjunto, o AHR mostrou ser relevante no controle da lesão do epitélio do intestino, da permeabilidade intestinal e da translocação de bactérias, especialmente cocos Gram-positivo, para o fígado. Ainda é necessário determinar a expressão de proteínas de barreira e de *Socs2* no intestino dos animais *Ahr*^{-/-}.

Como exposto anteriormente, a redução dos níveis de metabólitos microbianos de TRP, incluindo o Iald, foi concomitante à diminuição da atividade de AHR no intestino. Essas alterações coincidiram com o aumento discreto da lesão, elevação da permeabilidade intestinal e da translocação bacteriana observadas quando houve deficiência de AHR. Então, propôs-se avaliar o efeito da reposição de Iald em animais submetidos à mucosite intestinal. A administração de Iald resultou na proteção dos animais WT, marcada por uma redução do escore clínico de doença e da atividade de MPO e a prevenção de 100% da letalidade provocada pelo 5-FU. No entanto, isso não foi influenciado pela lesão, que foi semelhante entre os grupos,

ou permeabilidade intestinal, que foi maior nos animais tratados com Iald. Ao contrário dos estudos na literatura, que evidenciaram o papel do Iald na proteção contra IBDs, por meio da manutenção da integridade epitelial e diminuição da lesão do intestino. Esses efeitos podem estar associados à ativação de AHR e à modulação da microbiota pelo Iald (D’Onofrio et al., 2021; Renga et al., 2022). A administração de Iald alterou a composição e a função da microbiota, incluindo a expansão do conteúdo de bactérias produtoras de butirato ou de metabólitos de TRP (*Limosilactobacillus reuteri*) e a redução do conteúdo de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (D’Onofrio et al., 2021). Ainda, o Iald pode regular fatores de virulência de linhagens de *E. coli*, como a produção de toxina, formação de biofilme e motilidade e também reduzir a virulência e letalidade causada pela infecção por *Citrobacter rodentium* (Bommarius et al., 2013). Além disso, o Iald pode controlar a resposta inflamatória, a partir da redução da concentração de citocinas pró-inflamatórias (Langan et al., 2021). Porém, não há diferença na translocação bacteriana entre os grupos, apesar da permeabilidade intestinal mais elevada. Outro estudo mostrou que o tratamento com Iald não resultou em alterações histopatológicas, de permeabilidade intestinal e função de barreira. Porém, o Iald promoveu a proliferação de células epiteliais do intestino e a alteração da composição da microbiota (Zhang R et al., 2022). Então, mais análises são requeridas para a elucidação do mecanismo pelo qual Iald protege da letalidade induzida pelo uso de 5-FU, como a expressão de proteínas de barreira e perfil de citocinas inflamatórias. Além de confirmar se os efeitos desse metabólito são dependentes de AHR, a partir da análise da expressão de genes alvo da ativação de AHR no intestino de animais tratados com Iald e da atividade de β -galactosidase em animais *LacZ^{XRE}*.

Após determinar que o AHR desempenha um papel protetor na manutenção da integridade epitelial e no controle da translocação bacteriana e sugerir que metabólitos de TRP, incluindo a KYN, modularam a atividade desse receptor, buscou-se avaliar o papel de IDO1, principal enzima hospedeira envolvida na conversão do TRP em KYN, na mucosite intestinal. No intestino, houve redução da expressão de *Ido1* a partir do 5º dia do protocolo experimental, concomitante à queda da produção de KYN, que se mostrou significativa no dia 10 do protocolo experimental. A síntese de KYN pela enzima IDO1 corresponde a cerca de 95% do metabolismo de TRP (Taleb, 2019). De fato, a razão KYN/TRP, indicativa da atividade de IDO1, foi praticamente nula nos animais *Ido1^{-/-}*. Além disso, houve redução na expressão do gene *Cyp11a1* no intestino desses animais, no 5º dia após início do tratamento com 5-FU, o que sugere uma menor atividade de AHR nos animais *Ido1^{-/-}*.

Então, posteriormente, foi avaliado se essa deficiência na síntese de KYN resultaria em aumento da susceptibilidade à mucosite. Os animais *Ido1*^{-/-} apresentam alterações clínicas mais pronunciadas no 8º dia do protocolo experimental, acompanhadas de uma letalidade precoce e acentuada. Essa elevada susceptibilidade pode ser explicada pela maior permeabilidade intestinal e menor expressão de proteínas de barreira, no 5º dia após início do tratamento com 5-FU. Em modelo experimental de colite, a expressão aumentada de IDO1 induziu a diferenciação de células secretoras e a produção de muco no epitélio do intestino, o que contribui para a manutenção da função de barreira. Isso resultou na modulação da microbiota intestinal e resistência contra patógenos. Ainda, foi observada redução da lesão intestinal (Alvarado et al., 2019). Porém, não houve diferença na lesão intestinal dos animais *Ido1*^{-/-}, no presente modelo de mucosite. A translocação bacteriana também foi semelhante entre os grupos. Apesar de ser detectada translocação no meio Bile esculina apenas para o grupo de animais *Ido1*^{-/-}, no 5º dia do protocolo experimental, não houve diferença estatística em relação aos animais WT.

A microbiota dos animais *Ido1*^{-/-} também pareceu ser um fator determinante para o agravamento da mucosite. A análise do sequenciamento do DNA bacteriano das fezes de animais *Ido1*^{-/-} evidenciou diferenças na composição da microbiota em relação aos animais WT, tanto no nível basal quanto após o tratamento com 5-FU. Porém, assim como na análise descrita anteriormente para os grupos de animais WT, não houve diferença em relação à alfa-diversidade. Após a quimioterapia, animais *Ido1*^{-/-} apresentaram um aumento expressivo da abundância de membros das famílias Enterobacteriaceae (Filo Proteobacteria) e Prevotellaceae (Filo Bacteroidota), as quais estão associadas à maior gravidade da mucosite intestinal induzida por quimioterapia (Yu et al., 2019; Menezes-Garcia et al., 2020). No nível de gênero, esses animais apresentaram abundância relativa aumentada de *Bacteroides*, *Alloprevotella* e *Escherichia-Shigella*. Alguns membros de Prevotellaceae também apresentaram redução marcante, assim como as famílias Muribaculaceae, e Lachnospiraceae. Além disso, houve diminuição na abundância relativa de membros das famílias Akkermansiaceae e Helicobacteraceae nos animais *Ido1*^{-/-} submetidos à quimioterapia, diferentemente do observado nos animais WT. Dentre os gêneros reduzidos nos animais *Ido1*^{-/-} tratados com 5-FU destacam-se *Akkermansia*, os quais apresentam papel na proteção contra a perda de peso corporal e na manutenção da função de barreira intestinal (Wu Z et al., 2022). Como descrita, anteriormente, a relação dessas alterações ao agravamento ou controle de doenças

inflamatórias, sugere-se que a maioria dessas modificações da composição da microbiota possa contribuir para a maior susceptibilidade dos animais *Ido1*^{-/-} à mucosite.

Além da disbiose determinada no 8º dia após indução da doença, observou-se aumento da concentração dos metabólitos microbianos de TRP, incluindo Iald, no intestino de animais *Ido1*^{-/-}, no 3º dia do protocolo experimental. O I3S também aumenta no intestino dos animais *Ido1*^{-/-} tratados com 5-FU em relação aos animais WT. Esse metabólito é sintetizado no fígado, a partir de indóis provenientes do metabolismo de TRP, e consiste em uma toxina urêmica, que promove disfunção imune e endotelial (Kim et al., 2019). Por fim, a exposição à ampicilina não teve qualquer efeito na translocação bacteriana e na susceptibilidade dos animais *Ido1*^{-/-} à quimioterapia. Em conjunto, esses resultados indicam que IDO1 é importante para controlar a permeabilidade intestinal, a função de barreira e modular a microbiota, via síntese de KYN.

Conforme evidenciado o papel protetor da ativação de AHR por metabólitos de TRP na mucosite intestinal, buscou-se avaliar o papel de SOCS2 durante o curso da doença, uma vez que essa proteína é induzida por AHR e está envolvida no controle de doenças inflamatórias (Delgado-Ortega et al., 2013). Para isso, foi determinada a expressão do transcrito dessa proteína no intestino delgado de animais WT e utilizados animais *Socs2*^{-/-}. A expressão de *Socs2* mostrou redução no 5º ou 8º dias após início do tratamento com 5-FU e aumento no 10º dia. Como mostrado anteriormente, houve redução da atividade de AHR no 5º dia do protocolo experimental, coincidindo com a expressão reduzida de *Socs2*. Além disso, esses resultados ocorreram de forma simultânea às principais alterações induzidas pelo 5-FU, incluindo os parâmetros clínicos, inflamatórios, histopatológicos e de função de barreira, além da disbiose e translocação bacteriana. Por outro lado, o aumento da expressão de *Socs2* no 10º dia foi concomitante à maior concentração de KYN no plasma, o que sugere ativação de AHR e o controle da resposta inflamatória. Porém, a atividade de AHR ainda não foi determinada no 10º dia do protocolo experimental. Nos animais *Ido1*^{-/-}, a expressão basal de *Socs2* foi reduzida, assim como para o gene *Cyp1a1*, que é outro gene-alvo da atividade de AHR. Assim, é possível sugerir que a ativação de AHR por metabólitos de TRP, especialmente KYN, parece controlar a indução da expressão de *Socs2* pós-quimioterapia. Para confirmar essa hipótese, serão conduzidos experimentos avaliando a expressão de *Socs2* em animais *Ahr*^{-/-} e em animais WT tratados com Iald.

Concomitante à redução da expressão de *Socs2* no intestino de animais WT, observou-se maior susceptibilidade à mucosite intestinal dos animais *Socs2*^{-/-} em relação aos animais WT, com alterações clínicas mais acentuadas no 8º dia e letalidade precoce e expressiva. A lesão

intestinal induzida pelo 5-FU também foi maior nos animais *Socs2*^{-/-} em relação aos animais WT no dia 5 do protocolo experimental e permaneceu elevada no dia 8. Acompanhada dessa maior lesão no tecido, os animais *Socs2*^{-/-} apresentaram permeabilidade intestinal aumentada em relação aos animais WT, no 5º dia após indução da mucosite. A expressão das proteínas de função de barreira foi reduzida nos animais *Socs2*^{-/-}, o que corrobora para o comprometimento da integridade do epitélio intestinal observada nesses animais. Consistente com a maior lesão e permeabilidade intestinal, a translocação bacteriana também foi mais elevada nos animais *Socs2*^{-/-} em relação aos animais WT, no 8º dia do protocolo experimental. Em conjunto, SOCS2 foi relevante para atenuar a lesão do epitélio do intestino, a permeabilidade intestinal, a função de barreira e para conter a translocação bacteriana. Além de SOCS2, a inibição da expressão da proteína SOCS1 no intestino, após quimioterapia com metrotexato, resultou em aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (De Araújo et al., 2014), sugerindo que a regulação da inflamação seja um evento importante associado ao efeito protetor desempenhado por SOCS2 durante a quimioterapia. No entanto, mais análises são necessárias para entender o mecanismo pelo qual SOCS2 controla a função de barreira durante a mucosite intestinal, como avaliação da resposta inflamatória, incluindo citocinas pró-inflamatórias e a via de sinalização de NF-κB, cuja ativação é controlada por SOCS2 na inibição da inflamação (Li S et al., 2021).

Assim, nesse trabalho foi demonstrado que (i) o 5-FU promoveu alterações hematológicas, clínicas e lesão intestinal, acompanhadas do aumento da permeabilidade intestinal, comprometimento da função de barreira, disbiose e translocação bacteriana para o fígado; (ii) Houve alteração do metabolismo de TRP pela via das KYN e IDO1 é importante para controlar a permeabilidade intestinal, a composição da microbiota intestinal e a função de barreira; (iii) Metabólitos de TRP ativaram AHR, o qual contribui para o controle da lesão do epitélio do intestino, da permeabilidade intestinal e da translocação de bactérias para o fígado; (iv) SOCS2, que é induzida por AHR, protegeu da mucosite por meio do controle da lesão tecidual, da função de barreira e da translocação bacteriana. Então, o metabolismo de TRP e a ativação de AHR desempenharam um papel indispensável na proteção da mucosite intestinal induzida por 5-FU, a partir da atenuação da lesão tecidual, modulação da função de barreira e da composição e translocação bacteriana. Assim, estratégias que busquem restaurar ou manter a atividade dessa via após a quimioterapia podem representar numa forma efetiva de controlar alguns dos efeitos adversos mais marcantes associados à quimioterapia antineoplásica.

7 REFERÊNCIAS

Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 2018 Jun 13;23(6):716-724.

Al-Araimi A, Kharusi A Al, Oraba AB, Al-Maney MM, Sinawi S Al, Al-Haddabi I, et al. Deletion of SOCS2 reduces post-colitis fibrosis via alteration of the TGF β pathway. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).

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.

Alvarado DM, Chen B, Iticovici M, Thaker AI, Dai N, VanDussen KL, et al. Epithelial Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 Modulates Aryl Hydrocarbon Receptor and Notch Signaling to Increase Differentiation of Secretory Cells and Alter Mucus-Associated Microbiota. *Gastroenterology* [Internet]. 2019;157(4):1093-1108.e11.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em:< <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario> > Acessado em: 09 de abril de 2021.

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

Batista, R. 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. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 70. 2019.

Batista VL, da Silva TF, de Jesus LCL, Coelho-Rocha ND, Barroso FAL, Tavares LM, Azevedo V, Mancha-Agresti P and Drumond MM. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Paraprobiotics as a Therapeutic Alternative for Intestinal Mucositis. *Front Microbiol*. 2020 Sep 17;11:544490.

Biagioli M, Carino A, Fiorucci C, Annunziato G, Marchianò S, Bordoni M, Roselli R, Giorgio CD, Castiglione F, Ricci P, Bruno A, Faccini A, Distrutti E, Baldoni M, Costantino G, Fiorucci S. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Mediates the Counter-Regulatory Effects of Pelargonidins in Models of Inflammation and Metabolic Dysfunctions. *Nutrients*. 2019 Aug 7;11(8):1820.

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

Bommarius B, Anyanful A, Izrayelit Y, Bhatt S, Cartwright E, Wang W, et al. A Family of Indoles Regulate Virulence and Shiga Toxin Production in Pathogenic *E. coli*. *PLoS One*. 2013;8(1).

Borghi M, Pariano M, Solito V, Puccetti M, Bellet MM, Stincardini C, Renga G, Vacca C, Sellitto F, Mosci P, Brancorsini S, Romani L, Costantini C. Targeting the Aryl Hydrocarbon Receptor With Indole-3-Aldehyde Protects From Vulvovaginal Candidiasis via the IL-22-IL-18 Cross-Talk. *Front. Immunol*. 2019;10:2364.

Brandi G, Dabard J, Raibaud P, Di Battista M, Bridonneau C, Pisi AM, Morselli Labate AM, Pantaleo MA, De Vivo A, Biasco G. Intestinal microflora and digestive toxicity of irinotecan in mice. *Clin Cancer Res*. 2006;12(4):1299–1307.

Brawner KM, Yeramilli VA, Duck LW, Van Der Pol W, Smythies LE, Morrow CD, Elson CO, Martin CA. Depletion of dietary aryl hydrocarbon receptor ligands alters microbiota composition and function. *Sci Rep*. 2019 Oct 11;9(1):14724.

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.

Carr JS, King S, Dekaney CM. Depletion of enteric bacteria diminishes leukocyte infiltration following doxorubicin-induced small intestinal damage in mice. *PLoS ONE*. 2017;12(3):e0173429.

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.

Chelakkot C, Ghim J, Ryu SH. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp Mol Med* [Internet]. 2018;50(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>

Chen H, Zhang F, Li R, Liu Y, Wang X, Zhang X, Xu C, Li Y, Guo Y, Yao Q. Berberine regulates fecal metabolites to ameliorate 5-fluorouracil induced intestinal mucositis through modulating gut microbiota. *Biomed Pharmacother*. 2020 Apr;124:109829.

Chen J, Haller CA, Jernigan FE, Koerner SK, Wong DJ, Wang Y, et al. Modulation of lymphocyte-mediated tissue repair by rational design of heterocyclic aryl hydrocarbon receptor agonists. *Sci Adv*. 2020 Jan 15;6(3):eaay8230.

Chen Y, Liu Y, Wang Y, Chen X, Wang C, Chen X, et al. Prevotellaceae produces butyrate to alleviate PD-1/PD-L1 inhibitor-related cardiotoxicity via PPAR α -CYP4X1 axis in colonic macrophages. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):1–21.

Choi EJ, Lee HJ, Kim WJ, Han K Il, Iwasa M, Kobayashi K, et al. Enterococcus faecalis EF-2001 protects DNBS-induced inflammatory bowel disease in mice model. *PLoS One*. 2019;14(2):1–12.

Cussotto S, Delgado I, Anesi A, Dexpert S, Aubert A, Beau C, et al. Tryptophan Metabolic Pathways Are Altered in Obesity and Are Associated With Systemic Inflammation. *Front Immunol*. 2020;11(April):1–7.

D'onofrio F, Renga G, Puccetti M, Pariano M, Bellet MM, Santarelli I, et al. Indole-3-carboxaldehyde restores gut mucosal integrity and protects from liver fibrosis in murine sclerosing cholangitis. *Cells*. 2021;10(7).

De Araújo Júnior RF, Da Silva Reinaldo MPO, De Castro Brito GA, De FrançaCavalcanti P, De Moura Freire MA, De Medeiros CAX, et al. Olmesartan decreased levels of IL-1b and TNF- α , down-regulated MMP-2, MMP-9, COX-2, RANK/RANKL and up-regulated SOCs-1 in an intestinal mucositis model. *PLoS One*. 2014;9(12):1–20.

De Jesus LCL, Drumond MM, de Carvalho A, Santos SS, Martins FS, Ferreira Ê, et al. Protective effect of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* CIDCA 133 in a model of 5 Fluorouracil-Induced intestinal mucositis. *J Funct Foods* [Internet]. 2019;53(December 2018):197–207.

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.

Dobie R, MacRae VE, Pass C, Milne EM, Ahmed SF, Farquharson C. Suppressor of cytokine signaling 2 (Socs2) deletion protects bone health of mice with DSS-induced inflammatory bowel disease. *DMM Dis Model Mech*. 2018;11(1).

Donaldson G, Lee S, Mazmanian S. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14:20–32.

Dong D, Su T, Chen W, Wang D, Xue YL, Lu Q, et al. *Clostridioides difficile* aggravates dextran sulfate solution (DSS)-induced colitis by shaping the gut microbiota and promoting neutrophil recruitment. *Gut Microbes*. 2023;15(1):1–23.

Dvorak K, Coursodon-Boyiddle CF, Snarrenberg CL, Kananurak A, Underwood MA, Dvorak B. *Helicobacter hepaticus* increases intestinal injury in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2013;305(8):585–93.

Ehrlich AM, Pacheco AR, Henrick BM, Taft D, Xu G, Huda MN, et al. Indole-3-lactic acid associated with *Bifidobacterium*-dominated microbiota significantly decreases inflammation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):1–13.

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.

Fagundes CT, Amaral FA, Vieira AT, Soares AC, Pinho V, Nicoli JR, Vieira LQ, Teixeira MM, Souza DG. Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol.* 2012;188(3).

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.

Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: Expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2017;1397(1):66–79.

Griffith KL, Wolf RE. Measuring β -galactosidase activity in bacteria: Cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(1):397–402.

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.

Hayes CL, Dong J, Galipeau HJ, Jury J, McCarville J, Huang X, et al. Commensal microbiota induces colonic barrier structure and functions that contribute to homeostasis. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–14.

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.

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 PFC, Melo LFM, Nogueira AF, Costa JVG, Silva LMN, Santos CM, et al. 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;111(9):1611–21.

Kato S, Hamouda N, Kano Y, Oikawa Y, Tanaka Y, Matsumoto K, Amagase K, Shimakawa M. Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2017;44(10):1017-1025.

Kim PK, Huh HC, Cohen HW, Feinberg EJ, Ahmad S, Coyle C, Teperman S, Boothe H. Intracolonic vancomycin for severe *Clostridium difficile* colitis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2013 Dec;14(6):532-9.

Korecka A, Dona A, Lahiri S, Tett AJ, Al-Asmakh M, Braniste V, D'Arienzo R, Abbaspour A, Reichardt N, Fujii-Kuriyama Y, Rafter J, Narbad A, Holmes E, Nicholson J, Arulampalam V, Pettersson S. Bidirectional communication between the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) and the microbiome tunes host metabolism. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016 Ago;2:16014.

Langan D, Perkins DJ, Vogel SN, Moudgil KD. Microbiota-derived metabolites, indole-3-aldehyde and indole-3-acetic acid, differentially modulate innate cytokines and stromal remodeling processes associated with autoimmune arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(4):1–18.

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.

Li J, Lv J, Cao X, Zhang H, Tan Y, Chu T, et al. Gut microbiota dysbiosis as an inflammaging condition that regulates obesity-related retinopathy and nephropathy. *Front Microbiol.* 2022;13(November):1–16.

Li S, Han S, Jin K, Yu T, Chen H, Zhou X, et al. Socs2 suppresses inflammation and apoptosis during nash progression through limiting nf- κ b activation in macrophages. *Int J Biol Sci.* 2021;17(15):4165–75.

Ling N, Zhang X, Forsythe S, Zhang D, Shen Y, Zhang J, et al. *Bacteroides fragilis* ameliorates *Cronobacter malonaticus* lipopolysaccharide-induced pathological injury through modulation of the intestinal microbiota. *Front Immunol.* 2022;13(September):1–14.

Longley D, Harkin D, Johnston P. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:330–338.

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 Mar;12(3):330-4.

Marinelli L, Martin-Gallausiaux C, Bourhis JM, Béguet-Crespel F, Blottière HM, Lapaque N. Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–14.

Menezes-Garcia Z, Do Nascimento Arifa RD, Acúrcio L, Brito CB, Gouvea JO, Lima RL, Bastos RW, Fialho Dias AC, Antunes Dourado LP, Bastos LFS, Queiroz-Júnior CM, Igídio CED, Bezerra RO, Vieira LQ, Nicoli JR, Teixeira MM, Fagundes CT, Souza DG. Colonization by Enterobacteriaceae is crucial for acute inflammatory responses in murine small intestine via regulation of corticosterone production. *Gut Microbes.* 2020;11(6):1531-1546.

Meng Y, Zhang L, Li P, Yu J, Mu G, Li X, et al. *Saccharomyces cerevisiae* I4 Showed Alleviating Effects on Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis of Balb/c Mice. *Foods.* 2022;11(10):1–17.

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.

Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

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 Oxidative 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):1249-288.

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.

Nikolaus S, Schulte B, Al-Massad N, Thieme F, Schulte DM, Bethge J, Rehman A, Tran F, Aden K, Häslér 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.

Qi H, Li Y, Yun H, Zhang T, Huang Y, Zhou J, Yan H, Wei J, Liu Y, Zhang Z, Gao Y, Che Y, Su X, Zhu D, Zhang Y, Zhong J, Yang R. *Lactobacillus* maintains healthy gut mucosa by producing L-Ornithine. *Commun Biol.* 2019 May 8;2:171.

Qu L, Tan W, Yang J, Lai L, Liu S, Wu J, et al. Combination Compositions Composed of l-Glutamine and Si-Jun-Zi-Tang Might Be a Preferable Choice for 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis: An Exploration in a Mouse Model. *Front Pharmacol.* 2020;11(June):1–11.

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

Renga G, Nunzi E, Pariano M, Puccetti M, Bellet MM, Pieraccini G, et al. Optimizing therapeutic outcomes of immune checkpoint blockade by a microbial tryptophan metabolite. *J Immunother cancer.* 2022;10(3).

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. 64

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

Rothhammer V, Mascanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, Chao CC, Patel B, Yan R, Blain M, Alvarez JI, Kébir H, Anandasabapathy N, Izquierdo G, Jung S, Obholzer N, Pochet N, Clish CB, Prinz M, Prat A, Antel J, Quintana FJ. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat Med.* 2016 Jun;22(6):586-97.

Schanz O, Chijiwa R, Cengiz SC, Majlesain Y, Weighardt H, Takeyama H, Förster I. Dietary AhR Ligands Regulate AhRR Expression in Intestinal Immune Cells and Intestinal Microbiota Composition. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 30;21(9):3189.

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.

Scott SA, Fu J, Chang P V. Microbial tryptophan metabolites regulate gut barrier function via the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(32):19376–87.

Segers C, Mysara M, Claesen J, Baatout S, Leys N, Lebeer S, et al. Intestinal mucositis precedes dysbiosis in a mouse model for pelvic irradiation. *ISME Commun [Internet].* 2021;1(1).

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.

Shen J, Yang L, You K, Chen T, Su Z, Cui Z, et al. Indole-3-Acetic Acid Alters Intestinal Microbiota and Alleviates Ankylosing Spondylitis in Mice. *Front Immunol.* 2022;13(February):1–18.

Shen X, Bao W, Yu W, Liang R, Nguyen B, Liu Y. An improved method with high sensitivity and low background in detecting low β -galactosidase expression in mouse embryos. *PLoS One.* 2017;12(5):1–12.

Shim S, Lee JG, Bae CH, Lee SB, Jang WS, Lee SJ, et al. Claudin-3 expression in radiation-exposed rat models: A potential marker for radiation-induced intestinal barrier failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;456(1):351–4.

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, Bhoori 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.

Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol*. 2009;45(12):1015-20.

Sougiannis AT, VanderVeen BN, Enos RT, Velazquez KT, Bader JE, Carson M, Chatzistamou I, Walla M, Pena MM, Kubinak JL, Nagarkatti M, Carson JA, Murphy EA. Impact of 5 fluorouracil chemotherapy on gut inflammation, functional parameters, and gut microbiota. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2019; 80: 44-55.

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.

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.

Stolfi C, Maresca C, Monteleone G, Laudisi F. Implication of Intestinal Barrier Dysfunction in Gut Dysbiosis and Diseases. *Biomedicines*. 2022;10(2):1–27.

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.

Taleb S. Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases. *Front. Immunol*. 2019; 10:2113.

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.

Vanlancker E, Vanhoecke B, Stringer A, Van de Wiele T. 5-Fluorouracil and irinotecan (SN-38) have limited impact on colon microbial functionality and composition in vitro. *PeerJ*. 2017;5:e4017.

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.

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.

Vujkovic-Cvijin I, Dunham RM, Iwai S, Maher MC, Albright RG, Broadhurst MJ, Hernandez RD, Lederman MM, Huang Y, Somsouk M, Deeks SG, Hunt PW, Lynch SV, McCune JM. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with HIV disease progression and tryptophan catabolism. *Sci Transl Med*. 2013 Jul 10;5(193):193ra91.

Wada T, Sunaga H, Miyata K, Shirasaki H, Uchiyama Y, Shimba S. Aryl Hydrocarbon Receptor Plays Protective Roles against High Fat Diet (HFD)-induced Hepatic Steatosis and the Subsequent Lipotoxicity via Direct Transcriptional Regulation of Socs3 Gene Expression. *J Biol Chem*. 2016;291(13):7004-16.

Wang C, Xiao Y, Yu L, Tian F, Zhao J, Zhang H, et al. Protective effects of different *Bacteroides vulgatus* strains against lipopolysaccharide-induced acute intestinal injury, and their underlying functional genes. *J Adv Res.* 2022;36(1800):27–37.

Wang D, Li D, Zhang Y, Chen J, Zhang Y, Liao C, Qin S, Tian Y, Zhang Z, Xu F. Functional metabolomics reveal the role of AHR/GPR35 mediated kynurenic acid gradient sensing in chemotherapy-induced intestinal damage. *Acta Pharm Sin B.* 2021 Mar;11(3):763-780.

Wang J, Han L, Liu Z, Zhang W, Zhang L, Jing J, et al. Genus unclassified_Muribaculaceae and microbiota-derived butyrate and indole-3-propionic acid are involved in benzene-induced hematopoietic injury in mice. *Chemosphere.* 2023;313(December 2022):137499.

Wang L, Wang R, Wei GY, Wang S M, Du GH. Dihydrotanshinone Attenuates Chemotherapy-induced Intestinal Mucositis and Alters Fecal Microbiota in Mice. *Biomed Pharmacother.* 2020;128, 110262.

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.

Wrzosek L, Ciocan D, Hugot C, Spatz M, Dupeux M, Houron C, et al. Microbiota tryptophan metabolism induces aryl hydrocarbon receptor activation and improves alcohol-induced liver injury. *Gut.* 2021;70(7):1299–308.

Wu CH, Ko JL, Liao JM, Huang SS, Lin MY, Lee LH, et al. D-methionine alleviates cisplatin-induced mucositis by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal inflammation. *Ther Adv Med Oncol.* 2019;11:1–18.

Wu Z, Xu Q, Gu S, Chen Y, Lv L, Zheng B, et al. *Akkermansia muciniphila* Ameliorates *Clostridioides difficile* Infection in Mice by Modulating the Intestinal Microbiome and Metabolites. *Front Microbiol.* 2022;13(May):1–15.

Xia C, Jiang C, Li W, Wei J, Hong H, Li J, et al. A Phase II Randomized Clinical Trial and Mechanistic Studies Using Improved Probiotics to Prevent Oral Mucositis Induced by

Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma. *Front Immunol.* 2021;12(March):1–14.

Yan X xia, Li H long, Zhang Y ting, Wu S yan, Lu H lei, Yu X lu, et al. A new recombinant MS-superoxide dismutase alleviates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2020;41(3):348–57.

Yu C, Zhou B, Xia X, Chen S, Deng Y, Wang Y, Wu L, Tian Y, Zhao B, Xu H, Yang L. *Prevotella copri* is associated with carboplatin-induced gut toxicity. *Cell Death Dis.* 2019;10(10):714.

Yuan L, Zhang S, Li H, Yang F, Mushtaq N, Ullah S, et al. The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018;108(August):184–93.

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.

Zhao G, Williams J, Washington MK, Yang Y, Long J, Townsend SD, et al. 2'-Fucosyllactose Ameliorates Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Protecting Intestinal Epithelial Cells Against Apoptosis. *Cmgh.* 2022;13(2):441–57.

Zheng X, Mai L, Xu Y, Wu M, Chen L, Chen B, et al. Brucea javanica oil alleviates intestinal mucosal injury induced by chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in mice. *Front Pharmacol.* 2023;14(February):1–13.