

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso

**PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NO
DESENVOLVIMENTO E GRAVIDADE DE
MUCOSITE INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
MODELO MURINO**

Belo Horizonte

2014

Silvia Helena Sousa Pietra Pedroso

**PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NO
DESENVOLVIMENTO E GRAVIDADE DE MUCOSITE
INDUZIDA POR IRINOTECANO EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Co-orientadora: Dra. Angélica Thomaz Vieira

Belo Horizonte

2014

5

10

15

20

25

30

À minha eternamente amada avó Lygia

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos vão para:

5 O meu pai Enio e minha mãe Mariângela, que sempre me apoiam, incentivam, ouvem de coração aberto todas as minhas novas descobertas, como também minhas queixas e preocupações. Obrigada por me transmitir valores e princípios fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui.

10 O meu irmão Vinicius, por toda colaboração na execução deste trabalho, paciência e companheirismo.

A todos os meus familiares pela enorme torcida.

15 O Sandro, pela compreensão nos momentos de ausência, e amor.

A Tete e Rachel, por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem em todos os momentos da minha vida.

20 O Prof. Flaviano, pela oportunidade de realização deste trabalho, paciência, dedicação e orientação.

A Angélica, por todos os momentos de discussão, aprendizagem e amizade. Obrigada por me proporcionar amadurecimento e crescimento científico durante esses dois anos.

25

O Prof. Jacques, pelo grande exemplo de ética, caráter, professor e pesquisador.

A Profas. Beth e Silvia, pelos momentos de descontração.

30 Os professores Gifone Aguiar e Silvia Moura, pela disponibilidade em participar da banca avaliadora da minha dissertação.

O Prof. Daniel, por ter aceitado o encargo de relator e suplente da minha banca examinadora, e por todos os ensinamentos adquiridos durante o Treinamento Didático.

Os colaboradores deste trabalho: Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, Dra. Christiane Teixeira Cartelle, Dr. Valbert Nascimento Cardoso, Dr. Mauro Martins Teixeira, Dr. Marcelo Matos Santoro, por nos possibilitar a realização de experimentos que não poderíamos fazer em nosso laboratório.

5

A Profa. Simone Generoso, por todo o carinho, dedicação, amizade e ensinamentos.

O Jamil Silvano de Oliveira, que não poupou esforços para nos ajudar no experimento de dosagem do SN-38.

10

As meninas do NIPE: Bruna, Bel, Maria, Joana, Pâmela e Bia pelas várias tardes divertidas de experimento.

Os professores do Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG pelos ensinamentos.

15

O Rafa, por todo o companheirismo, amizade e artigos durante esses dois anos de Mestrado. Obrigada por me escutar nos momentos de desânimo e tristeza, me alegrar com o seu jeito tão especial de ser, e me empolgar com a difícil tarefa de fazer Ciência. Sem você, este trabalho não seria o mesmo.

20

O Léo, pela enorme disponibilidade, ensinamentos e amizade. Obrigada por tudo!

A Mayra, por ser minha BFF querida!

25 A Bárbara e Rafa, pelo apoio à distância. Obrigada por serem essas amigas tão especiais!

Os amigos do LEFM: Mário, Carol, Karine, Adriano, Luciana, Bianca, Camila, Igor, Raphael, Tássia, Andréia, Sheyla, Matheus, Bruno, Yaneisy, Marisleidys e Keila, que mais que colegas de laboratório, formam uma verdadeira família. Obrigada pelo carinho e

30

amizade que levarei para sempre!

Os amigos do LABio: Fabs, Ariane, Yasmim, Spencer, Luciana e Rebeca pela enorme solicitude e solidariedade.

A Claudilene e Nayara, pela enorme ajuda com os camundongos e os demais experimentos.

5 A Ericka e Samir, por terem me recepcionado de forma tão carinhosa no ICB e pela enorme e fundamental ajuda durante esses dois anos.

As meninas do LABIN: Rachel(s), Luciana e Bruna, pela enorme colaboração.

10 Os amigos do Departamento de Microbiologia: Silvinha, Lili, Maira, Ju, Rodrigo, Alide, Marliete, Vanessa, Jacqueline, João, Elisa, Renata, Anna Gabi, Alice, Hellem, Lorena, Galileu, Luis, João, Alessandra e Zazu por tornarem a minha caminhada muito mais agradável.

15 O Rodolfo, pelos pãezinhos da alegria e pela amizade.

As queridas amigas do Dom Silvério, pelos 12 anos de amizade e por me fazerem uma pessoa melhor e mais feliz a cada ano que passa ao lado de vocês.

20 A Raquel e Prof Raul, pelos conselhos, carinho e companheirismo.

As agências fomentadoras, por tornarem esse trabalho viável: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG). O CNPq, pela bolsa.

25 A Dra. Jamila Anba-Mondoloni, Unité Mixte de Recherches MICALIS, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, France, por gentilemente nos ceder as linhagens bacterianas utilizadas nesse trabalho.

30 A técnica do nosso laboratório, Clélia N. Silva, e os bioteristas do Laboratório de Gnotobiologia, Marcelo Gomes e Valner Mussel.

Obrigada a todos, que de alguma forma, tornaram este trabalho possível!

5

10

15

20

25

30

“O conhecimento nos faz responsáveis”

Che Guevara

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES

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

- 5 -Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

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

- Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli
10 -Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins
- Dra. Angélica Thomaz Vieira, pós doutoranda

Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG

- 15 - Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

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

- Profa. Dra. Rosa Maria Esteve Arantes
20 - Dra. Christiane Teixeira Cartelle, pós doutoranda

Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB/UFMG

- Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro
25 - Jamil Silvano de Oliveira

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

- Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso
30 - Profa. Dra. Simone Odília Fernandes

Departamento de Enfermagem Básica, Escola de Enfermagem, UFMG

- Profa. Dra. Simone de Vasconcelos Generoso

RESUMO

A mucosite é um dos efeitos colaterais mais debilitantes da quimioterapia e/ ou radioterapia, e alguns estudos relatam que uma microbiota intestinal alterada poderia ter
5 influência no seu desenvolvimento. Com relação à mucosite induzida pelo quimioterápico cloridrato de irinotecano, CPT-11, tem sido proposto que as bactérias produtoras da enzima β -glucuronidase poderiam estar envolvidas na amplificação dos efeitos deletérios da mucosite, por transformar novamente o metabólito inativo, SN-38G, na forma ativa, SN-38, após sua secreção intestinal. Entretanto, o real papel da microbiota, em especial das
10 bactérias produtoras de β -glucuronidase, nunca foi demonstrado. O objetivo do nosso estudo foi avaliar o papel da microbiota intestinal e a participação das bactérias produtoras de β -glucuronidase no desenvolvimento de mucosite induzida por CPT-11, em modelo murino. Camundongos convencionais (CV), isentos de germes (IG) e monoassociados com *Escherichia coli* produtora de β -glucuronidase (MN-TG1) ou *E. coli*, cujo gene codificador
15 para β -glucuronidase foi deletado (MN-L91) receberam por via intra-peritoneal o irinotecano nos dias 0, 1 e 2, e foram sacrificados no dia 5 para análises. Após a indução de mucosite, os animais CV apresentaram aumento significativo da atividade de MPO e EPO e níveis mais elevados de IL-1 β e TNF, quando comparados aos animais IG. Os camundongos CV também apresentaram maiores lesões no epitélio intestinal, coerente
20 com a sua permeabilidade intestinal aumentada. Além disso, os animais CV apresentaram aumento da produção de sIgA intestinal e de IgG e IgA no soro, ao passo que a IgG intestinal foi menor para o grupo CV do que para o grupo IG, ambos com mucosite induzida. A IL-10 foi maior no tecido intestinal de animais IG, o que auxilia na compreensão da hiporresponsividade deste último grupo de animais. A concentração de
25 SN-38 no fluido intestinal foi menor no grupo CV do que no grupo IG, o que justifica, em parte, o maior dano intestinal visualizado no grupo CV. A convencionalização de animais IG reverteu o fenótipo encontrado, evidenciando o papel importante da microbiota intestinal para o desenvolvimento da mucosite. A ativação do sistema imunológico, com a injeção de LPS por via intraperitoneal, demonstrou que o conjunto de sinais e sintomas
30 verificados durante a mucosite induzida por CPT-11 é devido à presença da microbiota e não ao estado de sistema imunológico ativado nesses animais. Além disso, os animais do grupo MN-TG1 mostraram um aumento da permeabilidade intestinal, quando comparados com os animais MN-L91, demonstrando, assim, o efeito da enzima β -glucuronidase para a conversão dos metabólitos. Os nossos dados revelaram que a microbiota intestinal,

especialmente as bactérias produtoras de β -glucuronidase, tem um papel no desenvolvimento de mucosite induzida por CPT-11 em modelo murino, e este conhecimento pode ser útil em casos clínicos, uma vez que a microbiota pode ser modulada via dieta, antibióticos ou o uso de pró-, pré- e simbióticos.

5

Palavras-chave: Mucosite, irinotecano, microbiota intestinal, β -glucuronidase, inflamação intestinal.

ABSTRACT

Mucositis is one of the most debilitating side effects of chemo and radiotherapy and some studies have reported that an altered intestinal microbiota could have influence on its development. Regarding the induced by irinotecan hydrochloride, CPT-11, it has been proposed that β -glucuronidase-producing bacteria could be involved in exacerbation of mucositis by transforming back the SN-38G inactive metabolite to active SN-38 form after its intestinal secretion. The aim of our study was to evaluate the role of the intestinal microbiota and β -glucuronidase-producing bacteria in the development of irinotecan-induced mucositis in a murine model. Conventional (CV), germ-free (GF), and monoassociated mice with *Escherichia coli* producing β -glucuronidase (MN-TG1) or *E. coli* strain deleted for the gene encoding β -glucuronidase (MN-L91) received CPT-11 i.p. by days 0, 1 and 2, and were sacrificed on day 5 for analysis. After mucositis induction, CV mice showed a significant increase in MPO and EPO activity and higher levels of IL-1 β and TNF when compared to GF mice. CV animals also showed more lesions of intestinal epithelium, coherent with their higher intestinal permeability. Additionally, CV animals showed increased production of intestinal sIgA and serum IgA and IgG, whereas the intestinal IgG was lower in CV than for IG animals, both with mucositis. The SN-38 level was lower in CV than in GF animals, which helps to understand, at least in parts, the increased intestinal damage seen in the CV. IL-10 level was higher in the intestinal tissue of GF animals, which helps to understand the hyporesponsiveness of these last animals. Conventionalization of animals reversed the phenotype found for the GF group to the CV one, evidencing the effect of the microbiota. Activation of the immune system with LPS injection demonstrated that the mucositis phenotype is due to the presence of the microbiota, and not to the activated immune system status. In addition, MN-TG1 mice showed an increased permeability when compared to MN-L91 animals, evidencing the effect of the β -glucuronidase to convert SN-38G into SN-38. Our data proved that intestinal microbiota, especially β -glucuronidase-producing bacteria, has a role in the development of irinotecan-induced mucositis in a murine model, and this knowledge may be helpful in clinical cases, since the microbiota may be modulated via diet, antibiotics or the use of pro-, pre- and symbiotics.

Keywords: mucositis, irinotecan, intestinal microbiota, β -glucuronidase, intestinal inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5-FU** - 5-Fluorouracil
- AGCC** - Ácidos graxos de cadeia curta
- 5 **APC** - 7-etil-10-[4-N-(5-ácido amino pentanóico) - 1- piperidino) carboniloxicamptotecina
- BSA** - Soroalbumina bovina
- CE** - Carboxilesterase hepática
- COX-2** - Ciclo-oxigenase-2
- CPT-11** - Cloridrato de Irinotecano
- 10 **CV** - Animal convencional
- CVO** - Animal convencionalizado
- DAB** – Aminobenzidina
- D.O.** - Densidade ótica
- DII** - Doenças Inflamatórias Intestinais
- 15 **DMSO** - Dimetil sulfóxido
- EPO** - Peroxidase eosinofílica
- FAO** (*Food and Agriculture Organization*) - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- GF** - do inglês, germ-free
- 20 **GN** - Animal gnotobiótico
- HE**- Hematoxilina e eosina
- HPLC** - do inglês High Performance Liquide Chromatography
- HSP** - Proteínas de choque térmico
- HTAB** - Brometo de hexadeciltrimetilamônio
- 25 **ICAM-1** - Molécula de adesão intracelular-1
- IG** - Animais isentos de germes
- IgG** - Imunoglobulina G
- IL-1 β** - Interleucina 1 beta
- IL-6** - Interleucina 6
- 30 **IL-8** - Interleucina 8
- iNOS** - Óxido nítrico sintase induzida
- kDa**-quilodalton
- LP** - Lâmina própria
- LPS** - Lipopolissacarídeo

- MAPK** - Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos
- MBq** - Megabecquerel
- MPO** - Mieloperoxidase
- NAG** - N-acetil glicosaminidase
- 5 **NF- κ B** - Fator Nuclear kappa B
- NLR** - receptores da família do tipo NOD
- nm** - Nanômetro
- NOD** - Domíniode oligomerização de nucleotídeos
- NPC** - 7-etil-10-(4-amino-1-piperidino) carboniloxicamptotecina
- 10 **OPD** - *o*-fenilenodiamina
- PAS/AB** - Técnica combinada de *Alcian Blue* e Ácido Periódico Combinado de Schiff
- PBS** - Tampão fosfato-salino
- PCNA** - Antígeno de proliferação celular nuclear
- pH** - Potencial hidrogeniônico
- 15 **ROS** - Espécies reativas de oxigênio
- rpm** - Rotações por minuto
- sIgA** - Imunoglobulina A secretória
- SN-38** - 7-etil-10-hidroxiamptotecina
- SN-38G** - SN-38 glucuronidado
- 20 **TGI** - Trato gastrointestinal
- TLR** - do inglês, *Toll-like Receptors*
- TMB** - Tetrametilbenzidine
- TNF** - Fator de necrose tumoral
- UPC-GT** - Urinina difosfato glicuronosil-transferase
- 25 **WHO** (*World Health Organization*) - Organização Mundial de Saúde
- ZO-1** - Zonula occludens 1
- ZO-2** - Zonula occludens 2
- ZO-3** - Zonula occludens 3

LISTA DE FIGURAS

	Figura 1: Os filos dominantes presentes em vários locais do trato gastrointestinal humano.....	26
5	Figura 2: Ligação de bactérias a receptores do tipo <i>Toll</i> (TLR) presente nas células epiteliais resulta na ativação de NF- κ B, resultando na liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias.....	28
	Figura 3: Diagrama que mostra as alterações clínicas que ocorrem durante o desenvolvimento da mucosite	32
10	Figura 4: Esquema mostrando os possíveis papéis da microbiota indígena no processo de desenvolvimento da mucosite.....	34
	Figura 5: Metabolismo da droga citotóxica irinotecano.....	38
	Figura 6: Delineamento experimental com identificação dos grupos.....	45
	Figura 7: Esquema da indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11.....	45
15	Figura 8: Esquema de reposição da microbiota dos animais isentos de germes e indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11.....	55
	Figura 9: Esquema de indução de inflamação sistêmica por LPS e indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11.....	55
	Figura 10: Esquema de monoassociação dos animais isentos de germes com as bactérias produtoras ou não de β -glucuronidase e indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11.....	56
20	Figura 11: Fotomicrografias de fígado de camundongos saudáveis e com indução de mucosite.....	58
	Figura 12: Fotomicrografias de jejuno de camundongos convencionais e isentos de germes saudáveis e camundongos convencionais e isentos de germes com mucosite induzida corados por HE.....	60
25	Figura 13: Fotomicrografias de jejuno de camundongos convencionais e isentos de germes saudáveis e camundongos convencionais e isentos de germes com mucosite induzida corados por PAS/AB.....	61
30	Figura 14: Fotomicrografias de jejuno de camundongos convencionais e isentos de germes saudáveis e camundongos convencionais e isentos de germes com mucosite induzida com Imuno-Histoquímica para PCNA.....	62
	Figura 15: Morfometria do jejuno de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	63

	Figura 16: Avaliação da permeabilidade intestinal de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	64
5	Figura 17: Avaliação da produção de imunoglobulina A secretória no soro de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	65
	Figura 18: Avaliação da produção de imunoglobulina A secretória no fluido intestinal de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	65
10	Figura 19: Avaliação da produção de imunoglobulina G no soro de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	66
	Figura 20: Avaliação da produção de imunoglobulina G no fluido intestinal de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	66
15	Figura 21: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no jejuno, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	67
20	Figura 22: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG no cólon de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	68
25	Figura 23: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG no pulmão de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	69
	Figura 24: Quantificação de citocinas no jejuno de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	70
30	Figura 25: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal de animais convencionais e isentos de germes saudáveis e convencionais e isentos de germes com mucosite induzida.....	70
	Figura 26: Fotomicrografias de jejuno de camundongos convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida. Coloração: HE-PAS/AB-Imuno-Histoquímica para PCNA.....	72
	Figura 27: Morfometria do jejuno, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	73

	Figura 28: Avaliação da permeabilidade intestinal, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	74
	Figura 29: Avaliação da produção de imunoglobulina A secretória (sIgA) no soro, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	75
5	Figura 30: Avaliação da produção de imunoglobulina A secretória (sIgA) no fluido intestinal, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	75
	Figura 31: Avaliação da produção de IgG no soro, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	76
10	Figura 32: Avaliação da produção de IgG no fluido intestinal, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	77
	Figura 33: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG no jejuno, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	78
15	Figura 34: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG no cólon, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	79
	Figura 35: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG no pulmão, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	80
20	Figura 36: Quantificação de citocinas no jejuno, com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	81
	Figura 37: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal com enfoque nos animais convencionalizados saudáveis e com mucosite induzida.....	82
25	Figura 38: Fotomicrografias de fígado de camundongos IG + LPS saudáveis e com indução de mucosite.....	83
	Figura 39: Fotomicrografias de camundongos IG + LPS e IG + LPS com mucosite induzida. Coloração HE-PAS/AB-Imuno-Histoquímica para PCNA.....	85
30	Figura 40: Morfometria do jejuno de animais, com enfoque para os animais IG + LPS e IG + LPS + CPT-11.....	86
	Figura 41: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG no jejuno, com enfoque para os animais IG + LPS e IG + LPS + CPT-11.....	87

Figura 42: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal. , com enfoque para os animais IG + LPS e IG + LPS + CPT-11..... 88

Figura 43: Avaliação da permeabilidade intestinal, com enfoque para os animais monoassociados..... 89

5 **Figura 44:** Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos no jejuno, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, com enfoque para os animais monoassociados..... 90

Figura 45: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal, com enfoque para os animais monoassociados..... 90

SUMÁRIO

	1.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
	1.1.O Trato Gastrointestinal.....	21
5	1.2. A Microbiota do TGI	22
	1.3.Relação da microbiota intestinal e desenvolvimento de doenças.....	28
	1.4.Mucosite	30
	1.4.1. Agente quimioterápico: Cloridrato de irinotecano	36
	1.5.O modelo animal gnotobiótico.....	37
10	2.0. JUSTIFICATIVA.....	41
	3.0. OBJETIVOS	42
	3.1. Objetivo geral	42
	3.2. Objetivos específicos	42
	4.0. METODOLOGIA	43
15	4.1. Animais	43
	4.2. Desenho experimental	44
	4.3. Indução de mucosite.....	44
	4.4. Análises histopatológicas do fígado, baço e intestino delgado	46
	4.4.1. Coloração HE	46
20	4.4.2. Técnica combinada de PAS/Alcian Blue	47
	4.4.3. PCNA	47
	4.4.4. Análise das lâminas e fotodocumentação.....	48
	4.4.5. Análises morfométricas do jejuno	48
	4.5. Determinação da permeabilidade intestinal.....	49
25	4.6.Dosagem de sIgA e IgG no soro e no fluido intestinal	49
	4.7. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no jejuno, cólon e pulmão por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG).....	50
30	4.7.1. Medida da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	50
	4.7.2. Atividade da enzima peroxidase eosinofílica (EPO)	51
	4.7.3. Atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG)	51
	4.8. Dosagem de citocinas	52
	4.9.Determinação de SN-38 no soro e no fluido intestinal	53

	<i>4.9.1. Preparação das amostras de fluido intestinal</i>	53
	<i>4.9.2. Preparação das amostras de soro</i>	53
	<i>4.9.3. Preparação da solução estoque e das soluções-padrão</i>	54
	<i>4.9.4. Condições para a cromatografia líquida</i>	54
5	4.10. Reposição da microbiota	54
	4.11. Indução de inflamação sistêmica por LPS	55
	4.12. Monoassociação de animais isentos de germes com bactérias não produtoras de β-glucuronidase e com bactérias produtoras β-glucuronidase	56
	4.13. Análises estatísticas	57
10	5.0. RESULTADOS	58
	5.1. Análises histopatológicas do fígado, baço e intestino delgado	58
	<i>5.1.2. Fígado e baço</i>	58
	<i>5.1.3. Intestino delgado (jejuno)</i>	59
	<i>5.1.4. Análises morfométricas do jejuno</i>	63
15	5.2. Determinação da permeabilidade intestinal	64
	5.3. Dosagem de imunoglobulina A secretória (sIgA) no soro e no fluido intestinal...	64
	5.4. Dosagem de IgG no soro e no fluido intestinal	65
	5.5. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG)	67
20	<i>5.5.1. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no jejuno</i>	67
	<i>5.5.2. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no cólon</i>	68
	<i>5.5.3. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no pulmão</i>	68
25	5.6. Dosagem de citocinas	69
	5.7. Determinação de SN-38 no fluido intestinal e no soro	70
	5.8. Reposição da microbiota intestinal	71
	<i>5.8.1. Fígado e baço</i>	71
	<i>5.8.2. Intestino delgado (jejuno)</i>	71
30	<i>5.8.3. Análises morfométricas do jejuno</i>	73
	<i>5.8.4. Determinação da permeabilidade intestinal</i>	74
	5.8.5. Dosagem de Imunoglobulina A secretória (sIgA) no soro e no fluido intestinal	74
	5.8.6. Dosagem de Imunoglobulina G (IgG) no soro e no fluido intestinal	76

	5.8.7. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG).....	77
	5.8.7.1. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no jejuno	77
5	5.8.7.2. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no cólon.....	78
	5.8.7.3. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no pulmão.....	79
	5.8.9. Dosagem de citocinas	80
	5.8.10. Determinação de SN-38 no fluido intestinal e no soro	81
	5.9. Indução de Inflamação sistêmica por LPS	82
10	5.9.1. Fígado e baço	82
	5.9.2. Intestino delgado (jejuno)	83
	5.9.3. Análises morfológicas do jejuno.....	86
	5.9.4. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG).....	87
15	5.9.4.1. Avaliação da presença de infiltrados no jejuno.....	87
	5.9.5. Determinação de SN-38 no fluido intestinal e no soro	88
	5.10. Monoassociação de animais isentos de germes com bactérias não produtoras de β-glucuronidase e com bactérias produtoras β-glucuronidase.....	88
20	5.10.1. Determinação da permeabilidade intestinal.....	89
	5.10.2. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos no jejuno.....	89
	5.10.3. Determinação de SN-38 no fluido intestinal.....	90
	5.11. Resumo dos resultados.....	91
	6.0.DISSCUSSÃO.....	93
25	7.0.CONCLUSÃO.....	101
	8.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
	9.0. ANEXO	116

1.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.O Trato Gastrointestinal

5 O trato gastrointestinal (TGI) se estende da cavidade bucal ao ânus, compreendendo também as glândulas associadas – glândulas salivares, fígado e pâncreas. Ele está envolvido na degradação e absorção dos alimentos, o que ocorre em cinco etapas principais: ingestão, fragmentação, digestão, absorção e eliminação dos resíduos (YOUNG *et al.*, 2006). Todos os componentes do TGI possuem certas características estruturais em
10 comum. Trata-se de um tubo oco composto por uma luz, ou lúmen, cujo diâmetro é variável, circundado por uma parede formada por quatro camadas distintas (da mais externa para a mais interna): mucosa, submucosa, muscular e serosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A mucosa apresenta revestimento epitelial formado por uma única camada de
15 células que formam uma forte barreira física e química. Tal característica é de suma importância, uma vez que a superfície do TGI está constantemente exposta a micro-organismos patogênicos e aos da própria microbiota normal (MALOY & POWRIE, 2011). A forte barreira física formada pelas células epiteliais é devido às complexas junções intercelulares compostas pelos tipos: oclusivas, aderentes e desmossomas. As primeiras são
20 componentes apicais do complexo juncional e criam uma barreira semipermeável entre as células. Já foram descritas quarenta proteínas diferentes que estão envolvidas nas junções oclusivas, entre elas: ZO (zonula occludens)-1, ZO-2, ZO-3, membros da família de proteínas guanilato cinases associadas à membrana, ocludina, claudinas, cingulina e 7H6 (BAUMGART & CARDING, 2007).

25 Além dessa proteção física, o epitélio intestinal também confere proteção química, por meio da produção de diversas substâncias antimicrobianas, muco, defensinas, catelicidinas e uma série de citocinas e quimiocinas (ELPHICK & MAHIDA, 2005; GUARNER, 2012). Outra importante característica do epitélio intestinal é a formação de diversas invaginações ou criptas em direção à lâmina própria (LP), o que possibilita, no
30 caso dos intestinos delgado e grosso, uma maior área de absorção. Finalmente, outra característica marcante é a rápida taxa de renovação celular presente neste tecido, produto da atividade das células estaminais localizadas nas zonas proliferativas entre as criptas e glândulas no intestino delgado (DEKANEY *et al.*, 2012). Tal atributo torna o epitélio

intestinal mais susceptível à quimioterapia ou radioterapia, por exemplo, já que os fármacos utilizados são tóxicos para tecidos caracterizados por rápida proliferação celular, como medula óssea, sistema linfático e TGI (MORRONE *et al.*, 2002).

Outra subcamada da mucosa é a LP, formada por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos, além de células musculares lisas, podendo também apresentar glândulas e tecido linfoide. Além disso, também apresenta uma camada muscular da mucosa formada por duas subcamadas delgadas de células musculares lisas, uma circular interna e outra longitudinal externa. Essa última subcamada separa a camada mucosa da submucosa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A submucosa apresenta tecido conjuntivo com muitos vasos sanguíneos e linfáticos, além de um plexo nervoso submucoso. Também podendo conter glândulas e tecido linfoide (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Já a muscular contém células musculares lisas orientadas em espiral, que são divididas em duas subcamadas de acordo com a direção principal seguida pelas células musculares. A subcamada interna apresenta sentido circular, enquanto a externa apresenta sentido longitudinal. Há plexo nervoso mioentérico e tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos e linfáticos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A serosa consiste-se em uma camada delgada, rica em tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, linfáticos e tecido adiposo. É revestida por um epitélio pavimentoso simples denominado mesotélio (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Segundo VLIET *et al.* (2010), o revestimento epitelial presente no TGI apresenta importantes funções, como: formar barreira seletivamente permeável entre o conteúdo do lúmen e os tecidos do organismo; facilitar o transporte e a digestão do alimento; promover a absorção dos produtos desta digestão; produzir hormônios que regulam a atividade do sistema digestório e promover a comunicação entre o corpo humano e a microbiota intestinal.

1.2. A microbiota do TGI

O TGI é colonizado por uma comunidade microbiana complexa, que se estima conter cerca de 100 trilhões de células, superando as do hospedeiro por um fator de 10. Essa comunidade é composta principalmente por bactérias, mas também inclui Archaeas, vírus, fungos e protozoários (DAVE *et al.*, 2012). O termo microbiota foi definido por

SAVAGE (1977) como a população de micro-organismos presentes em condições normais nas superfícies e mucosas de um indivíduo.

A colonização do TGI ocorre imediatamente após o nascimento: durante a passagem pelo canal do parto por micro-organismos vaginais ou fecais, bem como durante o aleitamento materno por micro-organismos presentes no leite como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (MACKIE, SGHIR & GASKINS, 1999; SERVIN, 2004; DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2010).

O perfil microbiano estabiliza e começa a se parecer com o “estado adulto” quando a criança atinge um a dois anos de idade (SEKIROV *et al.*, 2010). Essa fase de instalação da microbiota intestinal no recém-nascido é um período crítico durante o qual qualquer perturbação que possa ocorrer neste ecossistema, ainda frágil, pode ser extremamente prejudicial. Diversas evidências demonstram relações entre a microbiota intestinal e o desenvolvimento de alergias e doenças inflamatórias intestinais (DII) no adulto, o que pode ser justificado pela má colonização inicial (SWIDSINSKI & LOENING-BAUCKE, 2002; PENDERS *et al.*, 2013).

No adulto, a microbiota intestinal é extremamente densa e diversa, variando quantitativa, qualitativa e metabolicamente, em função da localização transversal e longitudinal no trato digestivo, e da idade do hospedeiro (NICOLI & VIEIRA, 2004; ECKBURG *et al.*, 2005).

A atividade metabólica da microbiota intestinal é comparável à do fígado, que é o órgão metabolicamente mais ativo do corpo humano (GILL & GUARNER, 2004). Determinadas bactérias da microbiota intestinal são capazes de fermentar oligossacarídeos indigeríveis, polissacarídeos vegetais (fibras), mucinas e proteínas não digeríveis, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que, por sua vez, podem ser usados como fonte de energia pelas células do cólon (HOLMES *et al.*, 2011). Dentre esses ácidos, o butírico é a principal fonte de energia do epitélio intestinal, e é relevante na manutenção da saúde do cólon. Vale ressaltar, também, que muitos membros da microbiota intestinal normal produzem vitaminas. A importância da microbiota na questão energética e na produção de vitaminas é mais claramente observada em animais isentos de germes (IG), ou animais axênicos, que são animais livres de qualquer forma de vida detectável (WOSTMANN, 1996). Comparado com os animais convencionais, os animais isentos de germes requerem 30% a mais de energia na sua dieta, sendo necessário, também, a

complementação alimentar com vitaminas K e do complexo B, que são produzidas pela microbiota, para a manutenção do seu peso corporal (ISOLAURI *et al.*, 2004).

Além de funções bioquímicas e digestivas, a microbiota normal desempenha outros papéis extremamente importantes, como proteção do hospedeiro. A presença da microbiota proporciona resistência à colonização, sendo esta a primeira linha de defesa contra a invasão por patógenos alóctones e por autóctones oportunistas. Essa resistência pode ser devido à produção de bacteriocinas e de ácidos orgânicos, competição por nutrientes e por sítios de adesão. Tal atributo da microbiota também pode ser mais claramente visto nos animais IG, uma vez que são mais susceptíveis às infecções bacterianas. Estudo realizado por Fagundes *et al.* (2012) demonstrou que os animais IG eram mais susceptíveis à infecção por *Klebsiella pneumoniae* em relação aos animais convencionais (CV). Todos os animais IG morreram após 72 horas da infecção enquanto nenhum animal convencional morreu durante o mesmo tempo. A microbiota também estimula o peristaltismo, o sistema imunológico e a maturação e renovação das células epiteliais do cólon, além de promover a estabilidade de uma população residente de monócitos e outras células inflamatórias na mucosa intestinal (FARTHING, 2004).

Ademais, recentes estudos da neurociência revelam importantes relações entre micro-organismos e comportamento animal, abrindo espaço para a descoberta de novas possíveis funções da microbiota intestinal. Estudos em animais IG jovens indicam que a microbiota intestinal influencia no desenvolvimento pós-natal da resposta hipotálamo-pituitária ao estresse (CRYAN & DINAN, 2012). Outro estudo envolvendo macacos *Rhesus* demonstrou que a separação maternal (entre 6 a 9 meses de idade) resultou em um substancial decréscimo na população de *Lactobacillus* presente nas fezes dos animais jovens (CRYAN & DINAN, 2012). O estresse crônico também parece modificar a microbiota intestinal, já que estudo realizado por Bailey *et al.* (2011) demonstrou que a microbiota intestinal de animais adultos que eram submetidos a um estresse físico era diferente da do grupo controle. Outro estudo realizado por Amaral *et al.* (2008) demonstrou que os animais IG apresentaram uma menor percepção de dor após diferentes estímulos inflamatórios. Essa percepção diminuída é dependente de IL-10, uma vez que essa citocina controla o processo inflamatório e é encontrada em níveis altos nos tecidos desses animais. A reposição da microbiota ou ativação de TLR 4 reverteu o fenótipo hiporresponsivo dos animais IG. No entanto, não se sabe ao certo os mecanismos pelos

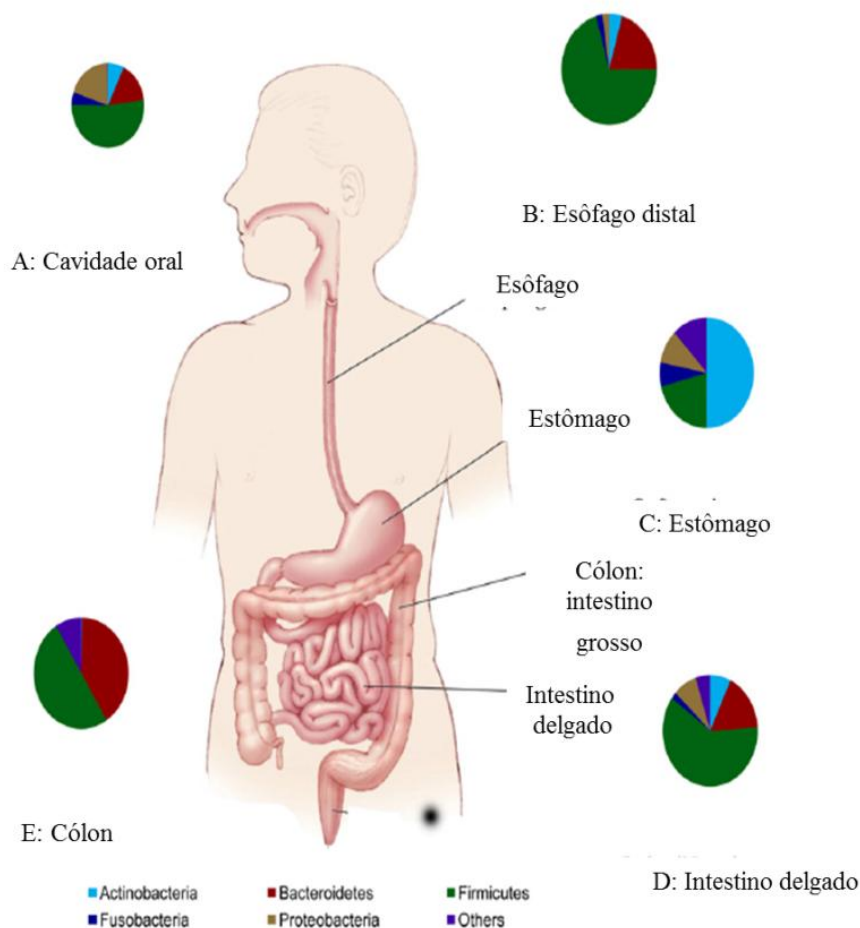
quais os micro-organismos estão relacionados ao comportamento animal e, portanto, constitui-se em um campo fantástico para a neurociência e a microbiologia.

Embora não seja conhecida a composição exata da microbiota normal humana, nos últimos anos, a implantação das técnicas de biologia molecular, bem como os avanços no “Projeto Microbioma Humano”, permitiram não somente conhecer melhor esta composição, como também compreender melhor a funcionalidade microbiana no TGI (ECKBURG *et al.*, 2005; DETHLEFSEN *et al.*, 2007; DAVE *et al.*, 2012). No total, a microbiota intestinal consiste de aproximadamente 500-1000 espécies que pertencem a apenas alguns dos filos bacterianos conhecidos. Estudos em fezes humanas e amostras de biópsias do cólon revelaram membros de nove filos distintos. Os filos mais abundantes são os Firmicutes e Bacteroidetes, com menor presença de membros dos filos Proteobacteria, Verrumicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria, Cyanobacteria, Spirochaetes e VadinBE97 (BACKHED *et al.*, 2005; ECKBURG *et al.*, 2005; SOMMER & BACKHED, 2013) (Figura 1). Em contraste, na biosfera, há um total de 70 filos bacterianos, o que realça o fato de que a microbiota intestinal humana é restrita a um pequeno subconjunto de filos, mas com um elevado grau de riqueza de espécies e abundância dentro deste núcleo de filos constituintes (DAVE *et al.*, 2012).

Dois gradientes de distribuição microbiana podem ser encontrados no TGI: a densidade microbiana aumenta da região proximal para a distal – com 10^1 - 10^3 células microbianas por grama de conteúdo no estômago e duodeno, 10^4 - 10^7 no jejuno e íleo, e 10^{11} - 10^{12} no cólon – e ao longo do eixo tecido-lúmen, com poucas bactérias aderidas ao tecido e ao muco, mas com um grande número presente no lúmen. Além disso, a diversidade microbiana aumenta conforme a densidade (SEKIROV *et al.*, 2010).

Os níveis populacionais de bactérias no intestino delgado variam consideravelmente ao longo dessa porção anatômica do trato digestivo. Na parte proximal (duodeno), são encontradas contagens baixas de bactérias anaeróbias facultativas. Nessa região os anaeróbios estritos são considerados população subdominante, devido à presença de quantidades elevadas de oxigênio. À medida que se percorre o intestino delgado, as populações totais bacterianas vão aumentando e uma inversão do tipo respiratório é observada (os anaeróbios facultativos, inicialmente dominantes, passam a ser subdominantes, e o fenômeno inverso é observado para os anaeróbios estritos). Na parte distal (íleo) do intestino delgado, os perfis populacionais se assemelham ao do intestino grosso. Na mucosa desse órgão são encontradas bactérias dos filos *Bacteroidetes* e

membros da ordem *Clostridiales*, enquanto no lúmen é encontrado enterobactérias (HAYASHI *et al.*, 2005; BOOIJINK *et al.*, 2010).



5

Figura 1. Os filos dominantes presentes em vários locais do trato gastrointestinal humano. Fonte: DAVE *et al.*, 2012 – modificado.

10

A manutenção de níveis baixos das populações bacterianas nas zonas de absorção do intestino delgado é importante para que não haja competição nutricional entre a microbiota e o hospedeiro. Esse nível populacional baixo é controlado por diferentes mecanismos e fatores inerentes a esses órgãos, como: baixo pH, sais biliares, intenso fluxo do conteúdo luminal, presença de imunoglobulina A secretória (sIgA), presença de compostos antimicrobianos como as defensinas, dentre outros (WALTER & LEY, 2011).

15

Já no intestino grosso, especialmente no cólon, o ambiente permite uma maior abundância microbiana devido à baixa concentração de sais biliares, pH menos ácido,

baixo peristaltismo, dentre outros fatores (WALTER & LEY, 2011). Estima-se que o cólon sozinho contenha mais de 70% de todos os micro-organismos do corpo humano (LEY, PETERSON & GORDON, 2006).

Outro aspecto importante a ser considerado é a interação entre microbiota e epitélio intestinal. Eles se relacionam por meio de dois grupos de receptores: da família *Toll* (*Toll like Receptors* – TLR) e as proteínas NOD (domínio de oligomerização de nucleotídeos) (SARTOR, 2006; BAUMGART & CARDING, 2007). Os dois grupos supracitados exercem importante papel na formação e modulação da resposta inflamatória (LOGAN *et al.*, 2008).

Os TLRs estão presentes na membrana das células epiteliais e reconhecem padrões altamente repetitivos na natureza, como constituintes microbianos (flagelina, LPS, peptidoglicano, dentre outros). Tal reconhecimento ativa um fator de transcrição nuclear conhecido como Fator Nuclear kappa B (NF- κ B), resultando em uma resposta inflamatória. Já as proteínas NOD estão presentes no interior das células e reconhecem produtos bacterianos. Segundo VLIET *et al.* (2010), a ativação dos NODs podem modular a resposta inflamatória mediada por TLR (Figura 2). Além destes dois receptores, as células dendríticas também exercem um papel importante na iniciação e/ou modulação da inflamação intestinal e, em adição, na indução de tolerância (BJORK *et al.* apud VLIET *et al.*, 2010).

O NF- κ B é um fator de transcrição considerado um mediador intracelular crítico da resposta inflamatória. Este constitui uma família de fatores de transcrição que contém as proteínas p65/RelA, c-Rel, Rel B, p50/NF- κ B1 e p52/NF- κ B2 em várias combinações para formar o dímero transcricionalmente ativo, induzindo a ativação de vários genes envolvidos na resposta inflamatória e imune. Dentre estes, os da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclo-oxigenase-2 (COX-2), citocinas: interleucina 1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6), além de quimiocinas (como a interleucina 8 - IL-8) (ROSSI *et al.*, 2007). As MAPK (Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos) dentre elas: ERK1/2, p38 e JNK, são uma família de proteínas sinalizadoras envolvidas em diferenciação celular, resposta a estresse, apoptose e inflamação (ROSSI *et al.*, 2007). Existem muitos relatos do papel das MAPK em muitos aspectos da resposta inflamatória, por exemplo, no recrutamento, ativação e apoptose de células inflamatórias (HALLETT *et al.*, 2008).

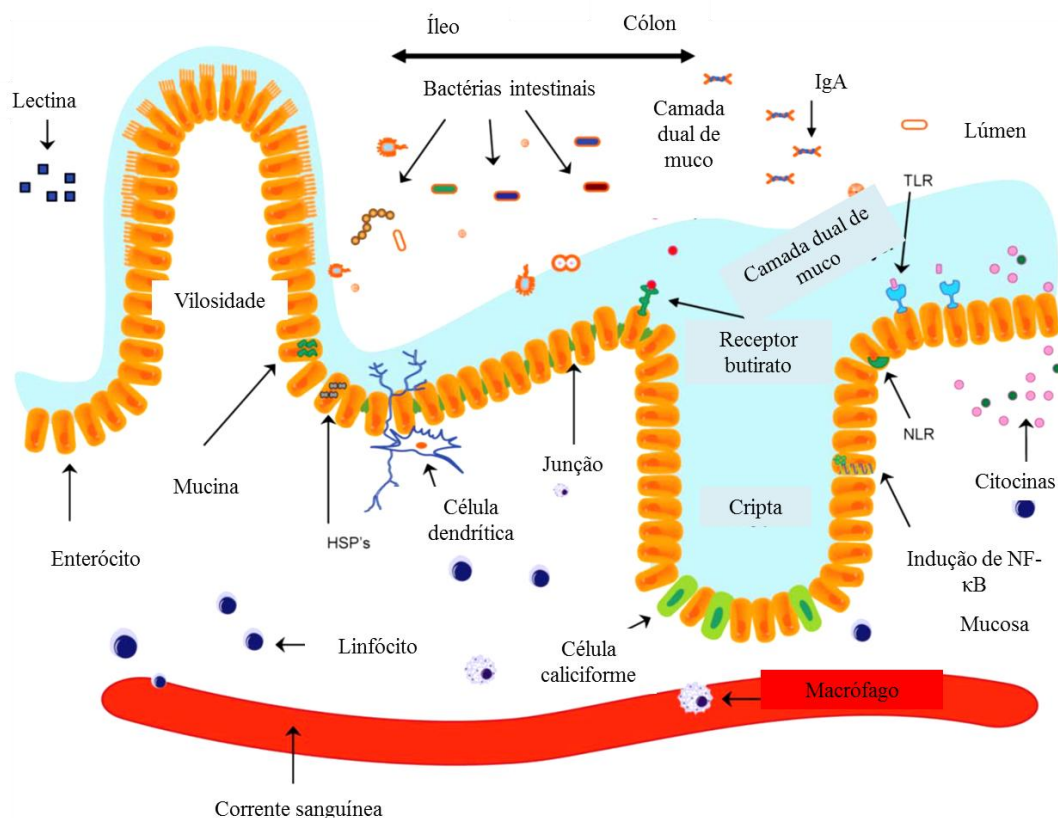


Figura 2: Ligação de bactérias a receptores do tipo Toll (TLR) presente nas células epiteliais resulta na ativação de NF- κ B, resultando na liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Após fagocitose, produtos bacterianos são internalizados e depois são reconhecidos por receptores da família do tipo NOD (NLR), resultando na modulação da resposta inflamatória. Células dendríticas são capazes de internalizar amostras bacterianas do lúmen. HSP, proteínas de choque térmico. Fonte: VLIET *et al.*, 2010 – modificado.

Uma das evidências da importância do equilíbrio microbiano no intestino reside no fato de que alguns micro-organismos são capazes de diminuir a ativação de NF- κ B. *Bifidobacterium infantis* e *Bacteroides thetaiotaomicron* são capazes de diminuir a ativação de NF- κ B com posterior diminuição do nível de endotoxina e citocinas pró-inflamatórias no plasma (STRINGER, 2013). Sendo assim, a microbiota indígena está relacionada às funções essenciais no hospedeiro, mas também pode estar relacionada à expressão clínica de doenças, quando a homeostase intestinal é perdida (GAREAU, SHERMAN & WALKER, 2010).

1.3. Relação da microbiota intestinal e desenvolvimento de doenças

Hipócrates tem sido reconhecido como o autor das seguintes frases: "A morte se aloja nos intestinos" e "a má digestão é a raiz de todos os males" no ano 400 a.C. (SEKIROV

et al., 2010). Tais observações já revelam o antigo interesse dos cientistas no esclarecimento de questões relacionadas à relação entre micro-organismos comensais e a manutenção da saúde ou desenvolvimento de doenças de seus hospedeiros.

Estudos recentes sugerem que a perda da homeostase intestinal tem uma importante
5 contribuição para o desenvolvimento das DII, tais como a colite ulcerativa e a doença de Crohn (ROGLER, 2011). Além disso, a microbiota intestinal parece desempenhar outros papéis importantes na etiologia e desenvolvimento de outras doenças como obesidade, alergias, dentre outras (VLIET *et al.*, 2010; HOLMES *et al.*, 2011).

Quanto às DII, há evidências tanto em seres humanos, como em modelos animais,
10 de que há uma resposta imunológica alterada contra os micro-organismos comensais no TGI (SEKIROV *et al.*, 2010). Exemplo disso, é que pacientes com DII apresentam maior título de anticorpos contra bactérias indígenas do que indivíduos saudáveis. Além disso, as áreas de lesão inflamatória são aquelas que estão em contato com um maior número de micro-organismos (ROUND & MAZMANIAN, 2009). Em estudo realizado com ratos, o
15 pré-tratamento com antibióticos aliviou a inflamação intestinal causada pela DII (ROUND & MAZMANIAN, 2009). Ademais, interessante, animais deficientes na produção da interleucina 10 (IL-10) e criados em condições convencionais desenvolveram espontaneamente colite crônica, enquanto os animais criados em condições assépticas não desenvolveram inflamação intestinal (SELLON *et al.*, 1998).

Quanto à obesidade, estudos recentes foram capazes de demonstrar que a
20 microbiota intestinal está diretamente envolvida na regulação da homeostase energética tanto em modelo murino como em seres humanos. Análises de sequências 16S de rRNA revelaram que animais obesos (ob/ob, caracterizados por uma mutação no gene que codifica a leptina) apresentavam uma redução de 50% na abundância de Bacteroidetes e
25 um correspondente acréscimo de Firmicutes, quando comparados aos animais magros (SEKIROV, 2010). Além disso, um estudo publicado recentemente, envolvendo gêmeos idênticos, revelou um resultado bastante interessante. Fezes de gêmeos idênticos – um obeso e outro magro – foram coletadas e transplantadas a animais IG que receberam o mesmo tipo de dieta. Os animais que receberam as fezes do gêmeo obeso tiveram um
30 aumento da adiposidade e um aumento da massa corporal quando comparados aos animais que receberam as fezes do gêmeo magro (RIDAURA *et al.*, 2013).

Quanto às alergias, há inúmeras evidências de que perturbações na microbiota intestinal, como resultado de uma exposição reduzida a micro-organismos, teria um efeito

inadequado de maturação do sistema imunológico, interrompendo a sequência normal de eventos que promovem o desenvolvimento de tolerância imunológica, aumentando, dessa forma, a incidência de hipersensibilidade alérgica (SEKIROV *et al.*, 2010). Tal conjunto de fatores é denominado de “Hipótese da Higiene”. Outros estudos envolvendo asma e alergias revelam a associação entre o desenvolvimento de tais doenças e a utilização de antibióticos na infância. Os níveis de *Bifidobacterium* e *Enterococcus* spp. mostraram-se positivamente associados a sintomas alérgicos nos primeiros meses de vida (SEKIROV *et al.*, 2010).

Recentemente, há um grande interesse em se estabelecer a relação entre a microbiota intestinal e doenças, tendo em vista uma melhor compreensão de suas fisiopatologias e, por consequência, uma melhor proposição terapêutica. Entre as doenças estudadas, está a mucosite oral e gastrointestinal.

1.4. Mucosite

A mucosite - oral ou gastrointestinal - é um dos efeitos colaterais mais debilitantes que o paciente submetido à quimioterapia e/ou radioterapia pode desenvolver. Caracteriza-se pela inflamação e perda celular da barreira epitelial do trato digestivo. A mucosite provoca uma série de sinais e sintomas, incluindo úlceras na cavidade oral, náuseas, vômitos, diarreia, azia e dor abdominal e na boca. Frequentemente, é grave o suficiente para justificar interrupções ou reduções no tratamento contra o câncer, levando a um aumento da taxa de mortalidade dos pacientes (SONIS, 2004; GIBSON & KEEFE, 2006).

O TGI é particularmente susceptível à terapia oncológica devido à sua elevada taxa de renovação celular realizada pelas células estaminais localizadas nas zonas proliferativas entre as criptas e glândulas no intestino delgado (DEKANEY *et al.*, 2012).

A mucosite também se configura como um problema econômico em oncologia. A presença de mucosite durante um ciclo de quimioterapia aumenta significativamente o risco de redução da dose, a frequência de infecções e hemorragias, bem como a duração e os custos de hospitalização (SAVARESE, HSIEH & STEWART, 1997). A utilização de recursos para pacientes durante episódios de mucosite é também aumentada significativamente com a necessidade de adjuntos nutricionais, incluindo a substituição de fluidos, dietas líquidas e nutrição parenteral total. Devido à associação com a infecção, a

antibioticoterapia é também mais comum em pacientes com mucosite e, com isso, mais um custo (ELTING *et al.*, 2003; ELTING *et al.*, 2007).

A prevalência da inflamação é variável e parece ser dependente do tipo de tratamento administrado e do câncer tratado. A mucosite ocorre em 80-100% dos pacientes submetidos a regimes denominados de “alto risco”, tais como a radioterapia na cabeça e pescoço, ou altas doses de quimioterápicos em células-tronco (ou medula óssea) transplantadas (PICO, AVILA-GARAVITO & NACCACHE, 1998; KEEFE *et al.*, 2000). Além disso, agentes específicos de quimioterapia citotóxica, tais como 5-fluorouracil (5-FU), estão associados com mucosites mais graves. Em regimes considerados de “baixo risco” para o desenvolvimento de toxicidade nas mucosas, a prevalência de mucosite pode ser de 10-15%. No entanto, devido ao número de pessoas que são tratadas por quimioterapia, essa taxa pode ser considerada significativa (RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

A fisiopatologia da lesão da mucosa tem sido objeto de intensa investigação, pois a elucidação dos mecanismos que levam à lesão auxiliaria no desenvolvimento de tratamentos orientados e mais adequados para prevenir a perda das funções da barreira da mucosa que conduzem a estes efeitos colaterais debilitantes e dolorosos da terapia antineoplásica (YEOH *et al.*, 2007). O que se sabe é que durante o desenvolvimento de mucosite gastrointestinal, algumas das características histopatológicas principais incluem a presença de enterócitos degenerados (GIBSON *et al.*, 2006; LOGAN *et al.*, 2008), atrofia do epitélio (GIBSON *et al.*, 2006), danos aos vasos da submucosa (PARIS *et al.*, 2001), infiltração de células inflamatórias (LOGAN *et al.*, 2008), hipersecreção de muco (STRINGER *et al.*, 2009) e aumento de bactérias patogênicas (STRINGER, 2008).

Em 2004, Sonis propôs um modelo para explicar a fisiopatologia da mucosite que inclui cinco fases: (i) iniciação; (ii) regulação positiva e geração de mensagem; (iii) sinalização e amplificação; (iv) ulceração e (v) cura (Figura 3).

A primeira destas fases é descrita como uma fase de iniciação, ocorrendo imediatamente a seguir à exposição a agentes citotóxicos, e resulta em danos teciduais diretos aos componentes da mucosa, como resultado da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A segunda fase - de regulação positiva e geração de mensagens - há ativação de fatores de transcrição importantes, em particular o NF- κ B. Este fator de transcrição é ativado em resposta à quimioterapia e radioterapia e é responsável pela regulação positiva de até 200 genes que têm efeitos sobre a integridade da mucosa por meio da indução de morte celular clonogênica (perda da capacidade celular de se

multiplicar), apoptose e lesão dos tecidos que compõem a mucosa, não se limitando ao epitélio (SONIS, 2004). A ativação de NF- κ B leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF, a IL-1 β e a IL-6) e está envolvido em pelo menos 12 vias relevantes para o desenvolvimento de mucosite (SONIS, 2004; BOWEN *et al.*, 2007).

5

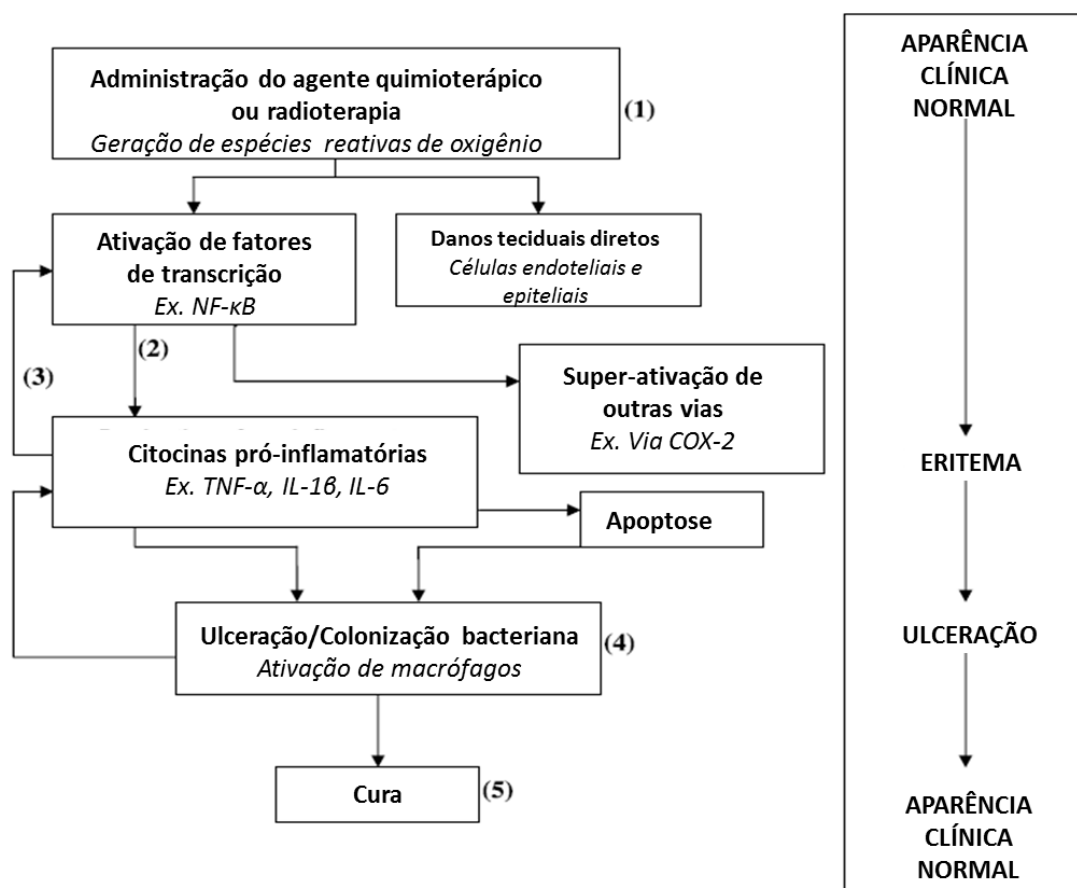


Figura 3. Diagrama que mostra as alterações clínicas que ocorrem durante o desenvolvimento da mucosite. Cinco fases são mostradas: 1) Iniciação; 2) Regulação positiva e geração de mensagem; 3) Sinalização e Amplificação; 4) Ulceração; 5) Cura. Fonte: LOGAN *et al.* (2008) – modificado.

10

A terceira fase envolve sinais de amplificação e ocorre como consequência da produção de citocinas pró-inflamatórias, que atuam via mecanismos de *feedback* positivo, causando a ativação adicional de NF- κ B, e subsequente aumento da produção de citocinas. Outras proteínas biologicamente ativas ou mediadores pró-inflamatórios, como a COX-2, também são superexpressos, e inicia-se uma cascata de reações inflamatórias que leva à ativação de metaloproteases de matriz, cuja produção culmina em danos teciduais adicionais. A fase ulcerativa se desenvolve onde clinicamente há uma violação do epitélio

15

acompanhado pela colonização bacteriana. É nessa fase que a mucosite se torna clinicamente evidente. O paciente irá sentir dor e sintomas, possivelmente abdominais, e o risco de infecção sistêmica aumenta. Além disso, produtos bacterianos podem estimular ainda mais a amplificação da produção de citocinas, levando à potencialização da lesão e, consequentemente, mais inflamação. Após a interrupção do tratamento contra o câncer devido à mucosite e seus efeitos, a fase final é a cura. Esta fase resulta na restauração da aparência normal da mucosa ocasionada pelo processo de renovação tecidual. A fase de cura é provavelmente a menos bem compreendida e estudada (SONIS, 2004; LOGAN *et al.*, 2008).

BOWEN *et al.* (2007) estudaram a expressão gênica no estômago, jejuno e cólon de ratos tratados com irinotecano (quimioterápico citotóxico) e seus resultados confirmaram o modelo de desenvolvimento da doença. Eles observaram que inicialmente os genes relacionados à resposta ao estresse, apoptose e ciclo celular foram ativamente expressos. Em seguida, houve maior expressão de genes relacionados com o processamento do RNA, tradução e sistema imune. Eles também demonstraram que as vias mais ativas eram: ativação do sistema de complemento, cascata de coagulação, ciclo celular e vias dependentes de NF- κ B.

Outros estudos também demonstraram que os mesmos genes são ativados na mucosite oral e do cólon. Isso indica que os mecanismos que causam injúria da mucosa são basicamente os mesmos no TGI. Contudo, algumas particularidades de cada inflamação são observadas como resultado das peculiaridades de cada compartimento do TGI (SONIS, 2004; YEOH *et al.*, 2007).

O modelo proposto por SONIS (2004) explica bem a fisiopatologia da inflamação, mas não deixa clara a importância que a microbiota simbiótica presente no TGI, principalmente no intestino, possui no desenvolvimento de mucosite. Apesar de nesse modelo a microbiota simbiótica estar envolvida apenas na fase de ulceração, outros estudos sugerem que ela pode ter outros papéis relevantes para a fisiopatologia de mucosite (BRANDI *et al.*, 2006; VLIET *et al.*, 2010). Segundo Stringer (2013), a microbiota também estaria relacionada à primeira fase – iniciação, uma vez que por meio da produção de ROS há uma alteração na oxigenação no intestino, o que terá efeito na comunidade microbiana presente no intestino. Inversões nas comunidades microbianas têm sido observadas em pacientes com ileostomia, com aumento de *Lactobacillus* e *Enterobacteriaceae* (STRINGER, 2013).

Alguns autores, ainda, acreditam que a microbiota normal pode desempenhar outros papéis relevantes para a fisiopatologia da inflamação, como participação (i) no processo inflamatório e no estresse oxidativo, (ii) na permeabilidade intestinal, (iii) na composição da camada de muco, (iv) na resistência a estímulos nocivos e mecanismos de reparação do epitélio, (v) além da ativação e liberação de moléculas imunes efectoras (VLIET *et al.*, 2010) (Figura 4).

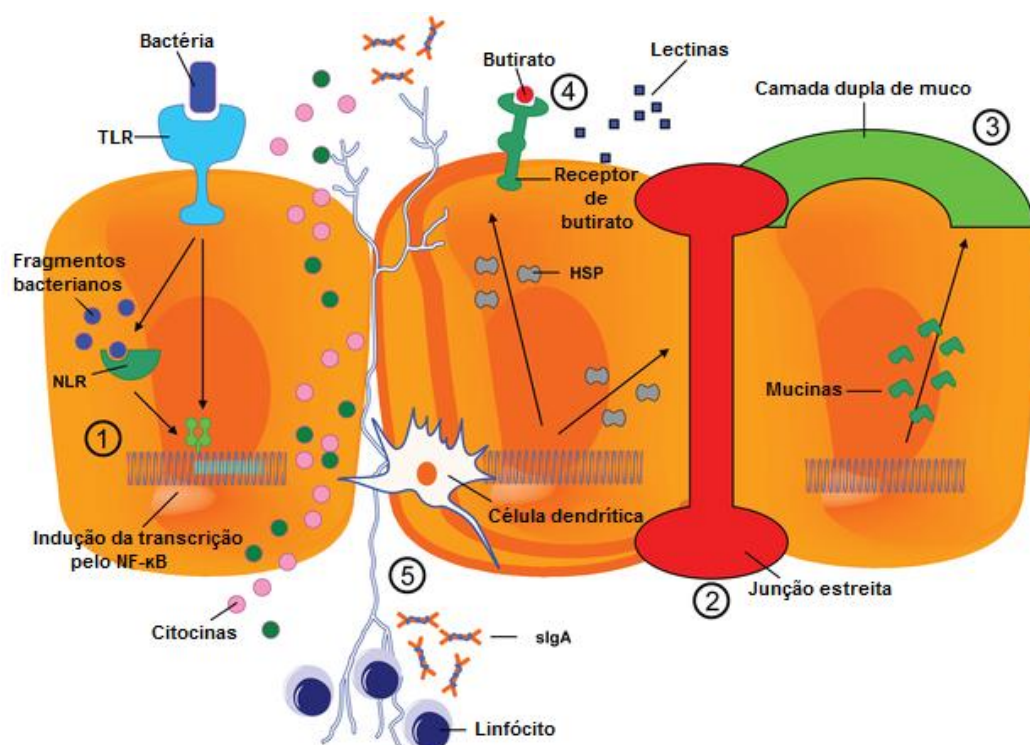


Figura 4. Esquema mostrando os possíveis papéis da microbiota indígena no processo de desenvolvimento da mucosite. Acredita-se que ela possa influenciar: 1) no processo inflamatório, 2) na permeabilidade intestinal, 3) na composição da camada de muco, 4) na resistência a estímulos nocivos e mecanismos de reparação do epitélio, 5) na ativação e liberação de moléculas imunes efectoras. Fonte: VLIET *et al.*, 2010 – modificado.

Estudos em modelos animais têm demonstrado que a população de enterobactérias, principalmente *Escherichia coli*, está aumentada no TGI de animais com mucosite induzida por quimioterápicos. Esse aumento tem sido observado independentemente da droga utilizada, mas, por outro lado, outras alterações na microbiota parecem ser dependentes do tipo de quimioterápico administrado, sendo que algumas dessas alterações são contrastantes entre si (STRINGER *et al.*, 2007; STRINGER, 2008; STRINGER *et al.*,

2009). Por exemplo, o tratamento com irinotecano causa aumento da população de *Clostridium* e *Staphylococcus* no jejuno; aumento de *Clostridium*, *Enterococcus*, *Serratia* e *Staphylococcus* no cólon, e diminuição de *Bifidobacterium* nas fezes (STRINGER *et al.*, 2007; STRINGER *et al.*, 2009). Já o 5-FU causa diminuição da população de *Clostridium*,
5 *Lactobacillus* e *Streptococcus* no jejuno, e *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* no cólon (STRINGER, 2008).

O aumento da população de *E. coli* (e de outras enterobactérias) em animais com mucosite induzida por irinotecano tem sido associado com a capacidade de produzirem β -glucuronidase. Esta enzima catalisa a conversão do irinotecano não tóxico (glucuronidado)
10 em irinotecano tóxico (desglucuronidado), que causa dano ao epitélio podendo levar à mucosite (BRANDI *et al.*, 2006; STRINGER *et al.*, 2007; STRINGER *et al.*, 2009). Outras bactérias como *Flavobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp. e *Clostridium* spp. também produzem β -glucuronidase (TRYLAND & FIKSDAL, 1998).

15 A importância da microbiota para a toxicidade ocasionada pelo irinotecano tem sido confirmada pelo uso de animais IG. Doses letais para ratos convencionais não causam danos à mucosa em ratos IG, nem ao menos ocasionam diarreia. A dose letal de irinotecano para ratos IG é três vezes maior do que para os ratos convencionais (CV). Sugere-se que parte desse efeito do irinotecano em animais CV deve-se à presença de
20 bactérias β -glucuronidase positivas (BRANDI *et al.*, 2006).

Apesar de sua frequência e significância clínica, não há tratamento efetivo para prevenir ou tratar a mucosite. As intervenções têm sido limitadas às lavagens paliativas, protetores de barreira, antimicrobianos tópicos, gelo e analgésicos (YEOH *et al.*, 2007).

Em relação ao quadro de diarreia provocado pela ação do irinotecano, os
25 medicamentos utilizados na prevenção/tratamento têm diferentes sítios de ação. Alguns agem diretamente na mucosa intestinal, controlando a absorção de água e eletrólitos ou modulando as reações imunológicas/inflamatórias (SHINOARA *et al.*, 1998). Outras drogas reduzem a concentração endoluminal do irinotecano ativo (SN-38) (WADKINS *et al.*, 2004).

30 A antibioticoterapia ainda é contraditória, mas tratamentos com antibióticos (penicilina, estreptomicina, e neomicina associada à bacitracina) em roedores e em duas pequenas séries de pacientes com diarreia tardia diminuiu o dano intestinal (em animais),

melhorou o quadro de diarreia, e inibiu a atividade da β -glucuronidase (TAKASUNA *et al.*, 1998; KEHRER *et al.*, 2000; KEHRER *et al.*, 2001; ALIMONTI *et al.*, 2003).

Mais estudos devem ser feitos visando tanto compreender o desenvolvimento da mucosite como terapias preventivas e curativas, uma vez que essa inflamação é grave e bastante prevalente em pacientes submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia.

1.4.1. Agente Quimioterápico: Cloridrato de irinotecano

Cloridrato de irinotecano (CPT-11) é uma droga antiproliferativa, que tem sido utilizada no tratamento de vários tipos de tumores sólidos, principalmente câncer colorretal (VANHOEFER *et al.*, 2001), e exerce o seu efeito citotóxico pela inibição da DNA topoisomerase I (enzima importante no alívio da tensão gerada pelas forquilhas de replicação).

Para o exercício de sua atividade antiproliferativa, o CPT-11 requer sua conversão no metabólito ativo 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38) pela carboxilesterase hepática (CE), principalmente a hCE2 (GIBSON *et al.*, 2002; FILHO, 2010). A CE encontra-se presente abundantemente no fígado, e em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. Esta enzima libera a cadeia lateral da dipiperidina presente na posição C-10 da molécula de CPT-11. Após a administração intravenosa, em seres humanos, o irinotecano tem meia-vida de aproximadamente 6 a 8 horas, enquanto que a meia-vida do SN-38 é de 11,05 horas (FILHO, 2010).

O metabolismo do CPT-11 é principalmente hepático por uma enzima do sistema CYP450 que gera componentes inativos como APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido amino pentanóico) - 1- piperidino) carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-(4-amino-1-piperidino) carboniloxicamptotecina). Pequena parte do APC pode ser metabolizada em SN-38 pela CE. Enquanto que o NPC é metabolizado completamente em SN-38 (FILHO, 2010).

O CPT-11 provoca efeitos secundários graves, que limitam a dose da droga. Estes efeitos colaterais incluem a mielossupressão e diarreia (ALIMONTI *et al.*, 2003). As características dos danos causados pelo CPT-11 no intestino delgado estão bem descritas e incluem o aumento da apoptose nas criptas, bem como a perda das vilosidades intestinais. O aumento da apoptose nas criptas da mucosa do cólon também foi observado (GIBSON *et*

al., 2003). Clinicamente, esse dano se manifesta como inchaço, diarreia e dor abdominal (PICO *et al.*, 1998; KEEFE & GIBSON, 2007).

A diarreia resultante do tratamento com irinotecano ocorre em duas fases. A primeira é observada dentro de 24 h após a administração da droga, e é um resultado dos seus efeitos colinérgicos. Esta diarreia é tratada com atropina e, na maioria dos casos, não é grave. A segunda fase da diarreia (diarreia tardia) desenvolve 5-11 dias após a administração do irinotecano. Essa diarreia é mais prolongada e pode ser potencialmente fatal devido à desidratação grave (ALIMONTI *et al.*, 2003), sendo observada em aproximadamente 70% dos pacientes tratados, e é mais elevada em monoterapia e nos primeiros ciclos (SALTZ *et al.*, 2000). Acredita-se que os efeitos tóxicos do CPT-11 na diarreia tardia podem ser potencializados por fatores relacionados com a microbiota intestinal (ALIMONTI *et al.*, 2003).

O metabólito ativo do CPT-11, SN-38, após ser ativado no fígado, sofre detoxificação por meio da conjugação com a enzima urinina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-GT), com a formação da espécie inativa SN-38G (SN-38 glucuronidado). SN-38G é secretado junto com a bile no lúmen do intestino delgado, e acredita-se que as bactérias que possuem as enzimas β -glucuronidasas (como as enterobactérias) convertam SN-38G de volta à sua forma ativa, o SN-38. Dessa forma, as implicações danosas do CPT-11 podem ser causadas tanto devido ao seu efeito sistêmico como o intraluminal (ALIMONTI *et al.*, 2003) (Figura 5).

1.5. O modelo animal gnotobiótico

Uma importante estratégia experimental para estudar as relações que ocorrem entre os micro-organismos e seus hospedeiros é a utilização de um modelo animal IG. Tal estratégia contribuiu para o desenvolvimento de um campo científico para este propósito denominado de gnotobiologia - derivada do grego, onde “gnotos” e “biota” significam, respectivamente, conhecida e vida (GUSTAFSSON, 1948).

O experimento gnotobiótico, iniciado desde a década de 1950, oferece considerável potencial como uma ferramenta no estudo das relações hospedeiro-micro-organismo porque: retrata o hospedeiro quando livre de germes, ou quando modificado por micro-organismos conhecidos ou outras associações; permite o estudo da relação inter-microbiana dentro do organismo do hospedeiro; pode ser usado no estudo de algum fator

com uma microbiota complexa conhecida, ou não, e que não é da própria espécie. O animal holoxênico ou CV apresenta uma microbiota complexa e desconhecida na sua totalidade e é criado sem precauções especiais desde o nascimento. O animal convencionalizado (CVO) é o animal ex-IG, que foi associado com uma microbiota normal de animais CV (GORDON & PESTI, 1971; GUSTAFSSON, 1984; ANDREMONT *et al.*, 1985).

Esses modelos são necessários, pois o estudo das interações entre linhagens bacterianas *in vitro* nem sempre pode ser extrapolado para o que realmente ocorre, *in vivo*, no tubo digestivo de animais GN (DUCLUZEAU, 1989). Esses animais são, também, uma excelente ferramenta para avaliar as mudanças anatômicas, fisiológicas e imunológicas induzidas pela microbiota autóctone e alóctone na mucosa intestinal (NICOLI, 1995).

Os animais IG apresentam uma série de aspectos fisiológicos, morfológicos e imunológicos diferentes daqueles encontrados na presença da microbiota normal. Esses animais possuem um grande aumento do ceco, devido, em grande parte, ao acúmulo de muco, que não é degradado na ausência dessas bactérias (GUSTAFSSON *et al.*, 1970). As vilosidades do intestino delgado são maiores e as criptas são mais curtas e contêm menos células (ALAM *et al.*, 1994). Além disso, apresentam menor espessura da parede intestinal, menor motilidade gastrointestinal, menor diferenciação epitelial e linfonodos reduzidos (GUARNER, 2012). As diferenças entre os animais CV e os IG são maiores nas regiões do trato digestivo, onde as densidades microbianas são normalmente maiores (FALK *et al.*, 1998).

Além das diferenças supracitadas, os animais IG também apresentam redução no peso dos órgãos, como coração, pulmão e fígado; menor débito cardíaco; menores níveis séricos de gama globulina; maior atividade locomotora e redução da ansiedade (GUARNER, 2012).

Outra importante aplicação dos animais IG são os estudos envolvendo fragmentos bacterianos, como o LPS, e o desenvolvimento imunológico. Em estudo avaliando a reperfusão de isquemia vascular, constatou-se que os animais IG eram grandes produtores de IL-10, e que tal característica contribuía para a hiporresponsividade ao potente estímulo inflamatório da reperfusão. Dessa forma, foi avaliado se a falta de resposta inflamatória observada nos animais IG se manteria a outros estímulos capazes de conferirem uma resposta sistêmica, tais como aqueles componentes derivados de micro-organismos, como o LPS. Tal componente foi injetado por via intraperitoneal. Os animais IG mantiveram

uma grande produção de IL-10 e não morreram mesmo após 10 dias após a injeção de LPS, enquanto os animais CV morreram após 12 horas do contato com LPS sistêmico (SOUZA *et al.*, 2004).

5 A tecnologia da gnotobiologia depende da habilidade de controlar a composição do ambiente no qual o organismo se desenvolve e funciona. O uso combinado de organismos geneticamente manipulados e GN têm o potencial de fornecer novas e importantes informações sobre como uma bactéria afeta o desenvolvimento normal, o estabelecimento e a manutenção do sistema imune associado à mucosa e às funções célula-epitélio. Além do mais, a gnotobiologia pode ajudar no estudo sobre as etiologias de doenças infecciosas, 10 condições inflamatórias agudas e crônicas (FEDORAK, 1995; SARTOR, 1995) e, possivelmente, em tumorigênese (GORBACH & GOLDIN, 1990).

Os equipamentos e procedimentos correntemente em uso que permitem a manutenção do “status” GN de animais experimentais incluem, em essência, equipamentos para transferência do feto maduro do útero para o interior de isoladores de plástico, 15 estéreis, supridos com filtros de ar e luvas de borracha. Procedimentos de rotina incluem criação e manutenção de animais gnotobióticos em isoladores, esterilização de dietas, água, cama e outros utensílios, por autoclavação, irradiação ou filtração, quando aplicável (DUCLUZEAU, 1989).

2.0. JUSTIFICATIVA

A mucosite representa um dos efeitos adversos mais importantes do tratamento oncológico, sendo capaz de afetar qualquer região do trato gastrointestinal, e manifesta-se com espectro de sinais e sintomas que variam desde dor oral devido à ulceração, distensão abdominal, vômitos e diarreia. Recentemente também foi sugerido que outras superfícies mucosas em todo o corpo, tal como o genitourinário e mucosas das vias aéreas, também podem ser afetadas.

Acreditava-se que a mucosite estaria relacionada apenas aos efeitos diretos dos agentes citotóxicos nos tecidos corporais. Estudos recentes, entretanto, têm constatado que a mucosite resulta de eventos primários e secundários complexos, e que a microbiota indígena poderia estar relacionada ao seu desenvolvimento. Quanto à mucosite induzida por CPT-11, há a hipótese de que a enzima β -glucuronidase bacteriana poderia converter o metabólito inativo (SN-38G) no ativo (SN-38) novamente. Tal transformação amplificaria os efeitos deletérios característicos da inflamação no ambiente intestinal. Estudos em modelo murino revelam uma maior concentração de bactérias produtoras da enzima e uma maior expressão de β -glucuronidase nos animais com mucosite induzida. No entanto, tais alterações encontradas apenas sugerem, sem afirmar, se a microbiota intestinal teria papel tão crucial para o desenvolvimento de mucosite, como hipotetizado.

Dessa forma, estudos envolvendo animais IG tornam-se de extrema importância para a pesquisa da fisiopatologia da mucosite induzida por CPT-11. Na literatura, há apenas um estudo envolvendo animais IG, que somente relata que a dose letal de CPT-11 para animais CV é maior do que para animais IG.

Nesse contexto, propusemos um estudo mais aprofundado envolvendo modelo de camundongos CV e IG a fim de se desvendar o real papel da microbiota indígena e da enzima β -glucuronidase no desenvolvimento de mucosite induzida por CPT-11.

3.0. OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

- 5 Avaliar o efeito da microbiota intestinal no desenvolvimento e gravidade das alterações intestinais associadas ao uso de CPT-11 em modelo murino.

3.2.Objetivos específicos

- 10 1) Avaliar, em nosso modelo murino, se os animais isentos de germes e convencionais apresentam alterações histopatológicas no intestino delgado, por meio da avaliação do número de células caliciformes, do nível de proliferação celular, arquitetura intestinal e de parâmetros que indiquem processo inflamatório.
- 15 2) Avaliar a alteração da permeabilidade e integridade intestinal nos grupos experimentais.
- 3) Verificar a produção das Imunoglobulinas A e G no soro e fluido intestinal dos animais.
- 4) Analisar diferenças com relação aos níveis de inflamação do intestino delgado, cólon, fígado e pulmão, por meio da dosagem de enzimas características de células de defesas e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias entre os grupos experimentais.
- 20 5) Avaliar se a reposição da microbiota intestinal ou a indução de inflamação sistêmica por LPS reverte o fenótipo dos animais isentos de germes.
- 25 6) Avaliar a relação entre microbiota intestinal e concentração de SN-38 no ambiente intra-luminal.
- 7) Avaliar a atividade das bactérias que produzem a enzima β -glucuronidase na permeabilidade intestinal, infiltrado de neutrófilos para o tecido e na concentração de SN-38 no fluido intestinal dos animais com mucosite induzida por CPT-11.
- 30

4.0. METODOLOGIA

4.1. Animais

5 A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foram conduzidos respeitando as normas estabelecidas pela “Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (SBCAL/COBEA, 2006). O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
10 (CEUA/UFGM), e os experimentos somente foram iniciados após a aprovação pelo comitê (protocolo 186/2012) (Anexo A).

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

Os camundongos isentos de germes de 6 a 8 semanas de idade, dos dois sexos, da linhagem NIH (Taconic, Germantown, USA), foram propagados no biotério de
20 Gnotobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, mantidos em isoladores flexíveis do tipo Trexler (Standard Safety Equipment Company, McHenry, USA) e manuseados de acordo com técnicas já estabelecidas (PLEASANTS, 1974) e adaptadas às nossas condições (SILVA, 1986). Para os experimentos, os camundongos serão mantidos em
25 microisoladores (UNO Roestvaststaal B.V., Zevenaar, The Netherlands), no biotério do Departamento de Microbiologia.

Os animais receberam *ad libitum* ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) esterilizada por calor úmido e água filtrada. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério, assim como aeração, umidade (60-80%) e temperatura ($22\pm1^{\circ}\text{C}$)
30 também foram controladas.

Os animais sofreram eutanásia por deslocamento cervical, sendo este procedimento precedido por anestesia geral com solução de cetamina/xilazina (0,6 mL de cetamina 100

mg/mL; 0,4 mL de xilazina 20 mg/mL e 4 mL de solução salina NaCl 0,9%) (Wirtz et al. 2007).

5 **4.2.Desenho experimental**

Os animais foram divididos em doze grupos: (i) animais CV, (ii) animais CV com mucosite induzida, (iii) animais IG, (iv) animais IG com mucosite induzida, (v) animais CVO, (vi) animais CVO com mucosite induzida, (vii) animais IG com LPS, (viii) animais IG com LPS e mucosite induzida, (ix) animais IG monoassociados com bactéria produtora de β -glucuronidase, (x) animais IG monoassociados com bactéria produtora de β -glucuronidase e mucosite induzida, (xi) animais IG monoassociados com bactéria não produtora de β -glucuronidase, (xii) animais IG monoassociados com bactéria não produtora de β -glucuronidase e mucosite induzida (Figura 6). Os grupos controle receberam a droga CPT-11 para indução de mucosite. Ao final do experimento, todos os animais foram eutanaziados para análises histológicas do fígado, baço e intestino delgado, assim como análises morfométricas de infiltrado inflamatório, altura de vilosidades, número de células caliciformes e índice de proliferação celular por área de mucosa; determinação da permeabilidade intestinal entre os diferentes grupos; dosagem dos níveis de sIgA e IgG no soro e no fluido intestinal; medida do influxo de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos a partir da produção de suas enzimas características (MPO, EPO e NAG, respectivamente); perfil de citocinas nos sítios de inflamação e determinação da concentração de SN-38 no fluido intestinal.

25

4.3.Indução de mucosite

Para indução de mucosite, foi utilizado o quimioterápico irinotecano. Os animais receberão 75 mg/kg de peso corpóreo por via intra-peritoneal, nos dias 0, 1, 2 e eutanasiados no dia 5 após a primeira dose. Tal modelo foi padronizado por nosso grupo de trabalho (Figura 7).

30

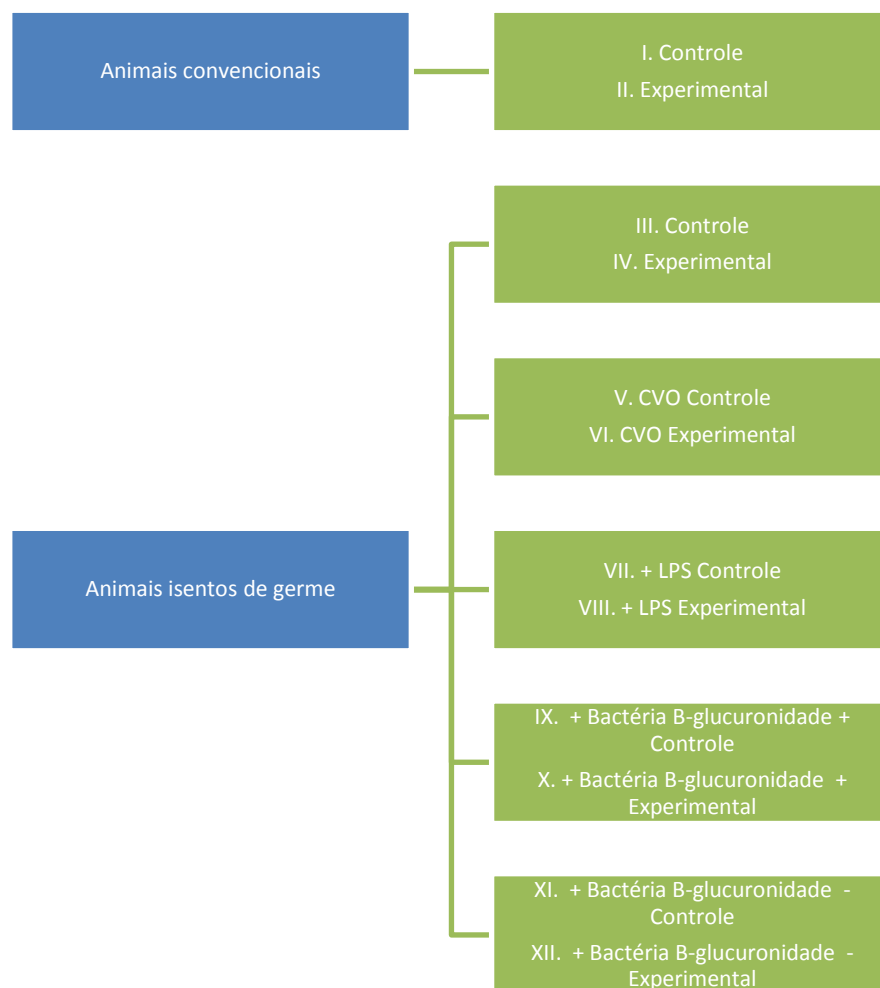


Figura 6: Delineamento experimental com identificação dos grupos. Os grupos controle e experimental receberam salina ou CPT-11, respectivamente, por via intra-peritoneal.

5

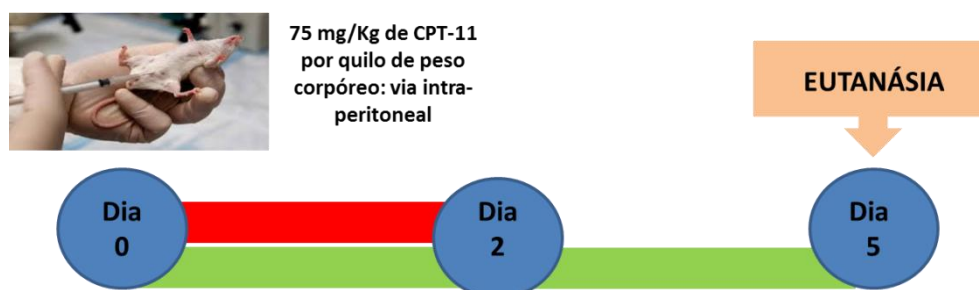


Figura 7: Esquema da indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11. Os círculos preenchidos em azul indicam a forma de contagem dos dias do experimento. A faixa verde indica o período em que o experimento ocorreu, enquanto a faixa vermelha indica o período de indução de mucosite.

10

4.4. Análises histológicas do fígado, baço e intestino delgado

O processamento do intestino delgado foi realizado de acordo com o método descrito por Calvert *et al.* (1989) e modificado por Arantes & Nogueira (1997). Seguindo
5 essa metodologia, os órgãos foram cortados separadamente e estendidos com a serosa em contato com o papel de filtro e abertos pela borda ante-mesentérica, removendo-se todo o seu conteúdo sem danos à mucosa. Estes foram transferidos para um recipiente contendo a solução de Bouin com 2% de ácido acético glacial por um período de 10 minutos para pré-
fixação. Os órgãos, pré-fixados, foram colocados sobre uma superfície plana e enrolados
10 em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (rocamboles), da porção distal em direção à proximal. Os rolos amarrados com linha foram fixados por imersão em solução de formol a 4%, por 24 horas.

As amostras de fígado e baço foram retiradas e imersas em solução de formol por 24 horas. As amostras de intestino delgado, baço e fígado, de 4 animais de cada
15 grupo, foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura. As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para interpretação histológica de rotina.

Foram realizados, também, cortes adicionais das lâminas de intestino delgado (jejuno) e estes foram corados pela técnica combinada de *Alcian Blue* e Ácido Periódico
20 Combinado de Schiff (PAS/AB) com adaptações da técnica descrita por McManus & Mowry (1960). Outro corte também foi utilizado para a realização da técnica de Imuno-histoquímica para marcação do antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA). Tal antígeno é uma proteína não histônica de 36-kDa, auxiliar da DNA polimerase, que se expressa em abundância em células em proliferação, estando presente somente nas fases
25 G1, S, G2 e M do ciclo celular.

4.4.1. Coloração HE

Cortes de 4 µm dos órgãos de cada animal foram desparafinizados e hidratados em
30 água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram corados pela Hematoxilina de Harris por 50 segundos e lavados em água corrente durante 20 minutos sendo em seguida corados pela Eosina por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas em Entellan (Merck).

4.4.2. Técnica combinada de PAS/*Alcian Blue*

As lâminas contendo cortes de jejuno, já desparafinados, foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram mergulhados em solução de equilíbrio (ácido acético 3%) por 3 minutos e imersos em solução de *Alcian Blue* 1% (pH 2,5) por 5 segundos. Em seguida, os cortes foram lavados com solução de equilíbrio e água destilada. Após esta etapa, as lâminas foram mergulhadas em solução aquosa de ácido periódico 0,5% por 5 minutos e incubadas em reativo de Schiff por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e contracoradas com Hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente por 15 minutos. Após a coloração, os cortes foram desidratados e as lâminas montadas em Entellan.

4.4.3. PCNA

As lâminas contendo cortes de jejuno foram desparafinizadas, hidratadas e colocadas em hidróxido de amônia 10%, em etanol 95% para remoção do pigmento formólico, e depois em água destilada. Em seguida as lâminas passaram pelo processo de recuperação antigênica com tampão citrato por 20 minutos. Os próximos passos foram o uso de bloqueio da peroxidase endógena em metanol/Peróxido de Hidrogênio (270 mL de metanol e 30 mL de Peróxido de Hidrogênio a 20%) por 30 minutos, bloqueio com BSA 2% por 30 minutos e os bloqueios Biotina/Avidina por 10 minutos cada, à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se o anticorpo primário PCNA (Rabbit Monoclonal Antibody – EPITOMICS na abcam company - 1:200) sobre os cortes e incubou-se *overnight*. O anticorpo secundário, imunoglobulina anti-coelho, anti-camundongo e anti-cabra biotinilada pré-diluída e estreptavidina-peroxidase pré-diluída (Kit LSAB2 System-HRP, DAKO, REF:K0675) foram consecutivamente utilizados por 30 minutos à temperatura ambiente. Entre cada etapa descrita, os cortes serão lavados por três banhos de PBS, 5 minutos cada.

A revelação da reação foi feita por incubação em solução de DAB (50mg de Diaminobenzidina em 200mL de PBS e 400µl de Peróxido de Hidrogênio 30%) durante 5 minutos. Posteriormente os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris diluída por 3 segundos, lavados em água corrente por 5 minutos, desidratados em concentração crescente de etanol, diafanizados em xilol e montados com Entellan (Merck).

4.4.4. Análise das lâminas e fotodocumentação

Todas as lâminas foram codificadas e observadas sequencialmente pela Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, Depto. de Patologia Geral/ ICB/ UFMG), que não teve acesso aos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pelas patologistas. Imagens obtidas ao microscópio Olympus BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) foram transferidas por meio de vídeo-câmera colorida Cool SNAP-Procf Color (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) para um sistema de vídeo acoplado ao computador por meio do programa Image-Pro Express versão 4.0 para Windows (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA).

4.4.5. Análises morfométricas do jejuno

15

Para as análises morfométricas do jejuno, foram obtidas fotografias em aumento de 10X de modo a abranger a maior área possível do órgão. Posteriormente seguiu-se a análise do comprimento das vilosidades, quantificação das células caliciformes e da área corada pelo PCNA.

Contagem do Infiltrado Inflamatório: O infiltrado Inflamatório foi avaliado a partir da contagem das células em cada imagem com o auxílio do programa ImageJ (versão 1.47f, Wayne Rasband/National Institutes of Health, USA - disponível on line no site <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). .

Comprimento das vilosidades: O comprimento das vilosidades foi mensurado da sua base ao seu ápice e os dados foram expressos em micrômetros utilizando ImageJ.

Quantificação das células caliciformes: As células caliciformes intactas foram contadas em cada imagem e a área total de mucosa quantificada também com o auxílio do ImageJ. Em seguida, fez-se a seguinte transformação, segundo Oliveira e colaboradores (2012): $\text{Número de células caliciformes/área} = (\text{número de células caliciformes} \times \text{menor área quantificada}) / \text{área total da mucosa}$. Os dados foram expressos em número de células caliciformes/ μm^2 de mucosa.

Quantificação da área corada pelo PCNA: A área de mucosa corada pelo PCNA e a área total de mucosa foram quantificadas em cada imagem utilizando o programa analisador de

imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany), do Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia geral-ICB/UFMG. Os resultados foram expressos, graficamente, como médias e desvios-padrão da área corada pelo PCNA/ área total de mucosa.

5

4.5.Determinação da permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi avaliada pela determinação da radioatividade no sangue após a administração oral de Ácido Dietilenotriamina Penta Acético marcado com ^{99m}tecnécio (^{99m}Tc-DTPA). Cinco animais de cada grupo supracitado no desenho experimental foram tratados e no dia da eutanásia receberam, por gavagem, 0,1 mL de solução contendo 18,5 MBq de ^{99m}Tc-DTPA. Após 04 horas (tempo suficiente para garantir a passagem do DTPA pelo TGI), os animais foram anestesiados e 500 µL de sangue foram coletados, colocados em tubos apropriados para a determinação da radioatividade e pesados. Os dados foram expressos como CPM/g (GENEROSO *et al.*, 2011).

4.6.Dosagem de sIgA e IgG no soro e no fluido intestinal

A determinação dos níveis de sIgA e IgG no fluido intestinal e no soro foi realizada pelo método de ELISA (MARTINS *et al.*, 2007). A dosagem de sIgA se dá de maneira quantitativa e de IgG, qualitativa. O sangue dos animais anestesiados foi coletado por punção cardíaca e centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o soro foi recolhido e mantido a -20°C para posterior dosagem. O intestino delgado foi removido pelo corte nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo foi retirado, pesado e lavado com salina fosfatada, pH 7,2, suplementada com inibidores de protease (1 µM de aprotinina; 25 µM de leupeptina; 1 µM de pepstatina e 1 mM de PMSF), na proporção de 2,0 mL de PBS para cada 500 mg do conteúdo. Depois de centrifugado a 5.000 x g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi recolhido e congelado a -80°C, para posterior dosagem das imunoglobulinas. Para a determinação das imunoglobulinas, foram utilizados para o revestimento das microplacas anticorpos anti-IgA (M-8769, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) e anti-IgG (M-5899, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) de camundongo, desenvolvidos em cabra. Utilizou-se os anticorpos, desenvolvidos em cabra, conjugados

com a peroxidase, anti-IgA (A-4789, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA) e anti-IgG (A-3673, SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A concentração de sIgA total foi determinada utilizando um padrão de IgA purificado (0106-01, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA). As leituras foram feitas, a 492 nm, em um leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc., Sunnyvale, USA) e a concentração de sIgA foi dada em µg/mL de conteúdo intestinal e a de IgG em Abs (D.O. 492).

4.7.Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos no jejuno, cólon e pulmão por meio da detecção de suas enzimas específicas mieloperoxidase (MPO), peroxidase eosinofílica (EPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG).

4.7.1. Medida da atividade da MPO

A avaliação da atividade da enzima MPO é utilizada como índice de recrutamento de neutrófilos nos tecidos. Utilizou-se um ensaio previamente desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia (ICB/UFMG) para dosagem dessa enzima em tecidos previamente homogeneizados (SOUZA *et al.*, 2000), com algumas modificações.

Sumariamente, fragmentos do jejuno, cólon, fígado e pulmão dos animais foram removidos e congelados a -80°C. Após o descongelamento, os tecidos (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foram homogeneizados em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl; 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O; 0,015 M Na₂-EDTA), utilizando-se homogenizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic), centrifugados a 10.000 rpm (10.621 g) por 15 minutos e os precipitados foram submetidos à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias. Após nova centrifugação os precipitados foram ressuspensos em tampão NaH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% e re-homogeneizados. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e submetidos a três ciclos de congelamento/descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). Os sobrenadantes foram descartados e a atividade da mieloperoxidase nestes precipitados ressuspensos foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (DO) à 450 nm utilizando

tetrametilbenzidine (TMB) (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.) e os resultados foram expressos como concentração da enzima presente em 100 mg de tecido.

5 4.7.2. Atividade da enzima EPO

A atividade da enzima EPO como quantidade relativa de eosinófilos no tecido foi avaliada por meio de testes enzimáticos como descrito anteriormente por Strath *et al.* (1985). A quantificação dos níveis de peroxidase de eosinófilos no tecido é utilizada como
10 uma maneira indireta de estimar a eosinofilia tecidual.

Para cada 100 mg de tecido pesado, foi adicionado 1,9 mL de PBS 5X (pH 7.2). Em seguida o tecido foi homogeneizado e centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi submetido a lise hipotônica por adição de 500 µL de salina 0,2%, seguido pela adição de 500 µL de salina 1,6%, suplementada
15 com glicose 5%. Em seguida, o material foi novamente centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 10 minutos, e o sobrenadante novamente desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,9 mL de PBS (pH 7.4), contendo 0,5% de HTAB. Essa solução foi novamente homogeneizada e 1 mL do homogenato foi transferido para um microtubo de 1,5mL, seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. A
20 amostra foi, então, centrifugada a 10.000 rpm (10.621 g) por 15 minutos a 4°C. Apenas o sobrenadante foi utilizado para quantificação da peroxidase. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo que em cada poço 75 µL de amostra ou branco (PBS) foi incubada com 75 µL de substrato (1,5 mM de *o*-fenilenodiamina, OPD, em tampão Tris-HCl - 0,075 µM pH 8 suplementado de H₂O₂ 6,6 mM). A placa foi incubada no escuro, em
25 temperatura ambiente, por aproximadamente 30 minutos, e a reação interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 1M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 492 nm.

4.7.3. Atividade da enzima NAG

30

A atividade da enzima NAG, como medida indireta da atividade de macrófagos, foi avaliada por meio de testes enzimáticos utilizando como substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina. Homogenatos dos tecidos foram incubados juntamente com o substrato e

o produto dessa reação, p-nitrofenol, foi quantificado por meio de um ensaio colorimétrico, conforme descrito por Bailey (1988). Este protocolo também foi destinado à obtenção de amostras para a dosagem de citocinas.

Fragmentos dos tecidos com aproximadamente 100 mg foram ressuspensos em 1 mL de solução de extração de citocinas (PBS contendo um coquetel de anti-proteases [0,1 mM PMSF, 0,1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinin A]) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem das citocinas. O pellet (100 mg de tecido em 1,9 mL de tampão) foi homogeneizado em tampão com pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaH₂PO₄.1H₂O, 0,015 M Na₂-EDTA). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). O precipitado foi submetido à lise hipotônica (500 µL de solução de NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%, 30 segundos após) para lise de hemácias, sendo em seguida centrifugado a 10.000 rpm (10.621 g) por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se 800 µL de solução salina 0,9% acrescida de Triton X-100 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e utilizadas para o ensaio enzimático. O mesmo consiste na adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH 4,5) a uma concentração final de 2,24 mM, a 100 µL do sobrenadante. A reação ocorreu a 37°C por 10 minutos, em placas de 96 poços. O término da reação deu-se pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6) e a leitura foi realizada a 405 nm em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como concentração da enzima em 100 mg de tecido.

4.8. Dosagem de citocinas no jejuno

Para avaliar a expressão de citocinas, fragmentos do jejuno com aproximadamente 100 mg foram ressuspensos em 1 mL de solução de extração de citocinas (PBS contendo um coquetel de anti-proteases (0,1 mM PMSF, 0,1 mM *benzethonium chloride*, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween-20. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm (10.621 g). Os sobrenadantes foram imediatamente coletados e armazenados a -80°C para posterior dosagem das citocinas. A dosagem de citocinas foi realizada pelo método de ELISA. Os kits para as citocinas foram

obtidos da R&D Systems (DuoSet). As instruções do fabricante para a realização dos ensaios foram seguidas (MARTINSet *al.*, 2011).

4.9.Determinação de SN-38 no soro e no fluido intestinal

5

A preparação do soro e do fluido intestinal para a quantificação do SN-38 foi feita como posteriormente descrito. Esse metabólito foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês High Performance Liquid Chromatography)(modelo LC-20AD/T LPGE KIT) de acordo com Bansal e colaboradores (2008) (com

10 modificações).

4.9.1. Preparação das amostras de fluido intestinal

Resumidamente, uma alíquota de 1 mL de diclorometano : tert-butil metil etil (na

15 proporção de 3:7, respectivamente) foi adicionada a 100 µL de fluido intestinal. Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex durante 5 min e manualmente durante 10 min. Subsequentemente, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g durante 10 min à temperatura ambiente, e dessa forma, a camada aquosa e a orgânica foram separadas. Novecentos µL da fase orgânica foram transferidos para um microtubo novo e essa solução

20 foi evaporada até à secura sob vácuo a 40°C. Os extratos secos foram ressuspensos em 150 µL de 10:90 (v/v) de acetonitrila: água (pH 3,0) e agitados em vórtex e sonicador, ambos por 5 min. Por fim, 350 µL de água (pH 3,0) foram adicionados ao tubo e um volume de 500 µL foram injetados no sistema de HPLC.

25

4.9.2. Preparação das amostras de soro

Foram misturados 100 µL de amostra de soro com 100 µL de acetonitrila contendo 0,1% de ácido acético glacial, resultando na precipitação de proteínas. Após rigorosa agitação em vórtex durante 5 min, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10

30 minutos a 4°C. Uma alíquota de 150 µL do sobrenadante foi transferida para um microtubo novo. 50 µL dessa solução foi adicionada a 450 µL de água (pH 3,0) e essa mistura foi injetada no sistema de HPLC.

4.9.3. Preparação da solução estoque e das soluções-padrão

Resumidamente, a solução de estoque primária foi preparada diluindo-se o SN-38 (Sigma-Aldrich) em dimetil sulfóxido (DMSO) para se obter uma concentração de 2 mg/mL. Soluções-padrão foram preparadas em duplicata por diluição em série em acetonitrila contendo 0,1% de ácido acético glacial para se conseguir soluções com concentrações de 500 µg/mL a 1 ng/mL.

4.9.4. Condições para a cromatografia líquida

As separações cromatográficas foram feitas usando uma coluna de aço inoxidável Discovery, C18, Supelco® (25 cm x 4,6mm, 5µm), que foi mantida a 35°C. As amostras de 500 µL foram injetadas dentro do sistema de HPLC. A fase móvel consistiu de 100% de acetonitrila (fase móvel A) e água ultradestilada, ajustada para o pH 3,0 com 20% de ácido *o*-fosfórico (fase móvel B) na taxa de fluxo de 1mL/min. A coluna foi inicialmente equilibrada com 10% do solvente A e 90% do solvente B. Depois da injeção, a concentração do solvente A foi aumentada linearmente até 80% e do solvente B diminuída linearmente para 20% ao longo de 15 minutos. O A: B foi, em seguida, mantido a 80:20 durante 5 minutos. Após esse tempo, o sistema foi devolvido, de forma linear, às condições originais (solvente A a 10% e de solvente B a 90%), ao longo de 5 minutos e foi equilibrado durante 5 minutos antes da próxima injeção. O tempo de corrida para cada amostra foi de 35 minutos.

4.10. Reposição da microbiota

A reposição da microbiota foi obtida pela administração de um mesmo pool de fezes de animais convencionais. As fezes foram removidas de animais convencionais e foram homogeneizadas em solução salina (10%). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia ICB/UFMG e tiveram livre acesso à ração comercial e água. Após 14 dias, os animais foram submetidos à indução de mucosite como descrito no item 4.3. A fim de avaliar se houve colonização, as fezes foram retiradas e colocadas em meio tioglicolato para verificação de crescimento microbiano (FAGUNDES *et al.*, 2012). Estes animais foram chamados convencionalizados (CVO). Todas as análises mencionadas

anteriormente foram realizadas novamente afim de se verificar variação de fenótipo observado no animal isento de germe (Figura 8).

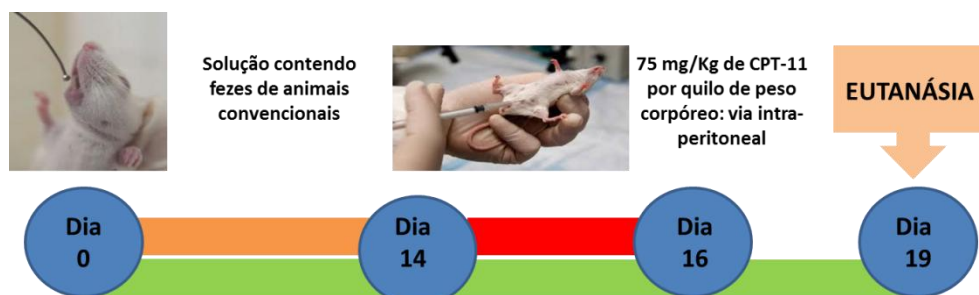


Figura 8: Esquema de reposição da microbiota dos animais isentos de germes e indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11. Os círculos preenchidos em azul indicam a forma de contagem dos dias do experimento. A faixa verde indica o período em que o experimento ocorreu, a faixa vermelha indica o período de indução de mucosite, enquanto a faixa laranja indica o período de convencionalização.

4.11. Indução de inflamação sistêmica por LPS

LPS (30 mg/kg, obtido de *Escherichia coli* sorotipo 0111 : B4, Sigma-Aldrich) foi administrada por via intraperitoneal aos animais isentos de germes 48 horas antes da indução da mucosite (FAGUNDES *et al.*, 2012) a fim de se avaliar se a microbiota é necessária para o metabolismo do composto ativo do CPT-11 (Figura 9). Foram analisados os seguintes parâmetros: histologia, morfometria, infiltrado inflamatório por meio da dosagem das enzimas MPO, EPO e NAG no jejuno e concentração de SN-38 no fluido intestinal e no soro.

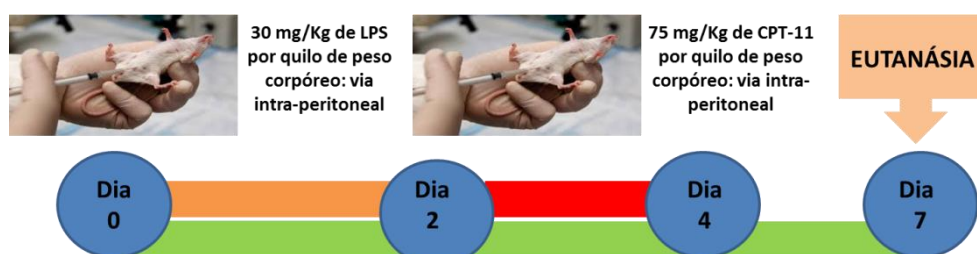


Figura 9: Esquema de indução de inflamação sistêmica por LPS e indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11. Os círculos preenchidos em azul indicam a forma de contagem dos dias do experimento. A faixa verde indica o período em que o experimento ocorreu, a faixa vermelha indica o

período de indução de mucosite, enquanto a faixa laranja indica o período de indução de inflamação sistêmica.

4.12. Monoassociação de animais isentos de germes com bactérias não produtoras de β -glucuronidase e com bactérias produtoras β -glucuronidase

As bactérias produtoras de β -glucuronidase (TG1) e as bactérias não produtoras de β -glucuronidase (L91), ambas linhagens de *Escherichia coli*, foram gentilmente cedidas pela Dra. Jamila Anba-Mondoloni, pesquisadora do Instituto Nacional de Pesquisa Agronômica da França. A L91 teve seu gene codificador da enzima substituído por um gene que codifica resistência ao antibiótico Kanamicina (BEAUD, 2005). Logo que as bactérias chegaram ao Laboratório de Agentes Bioterapêuticos (ICB/UFGM), foi realizada a ativação das bactérias, congelamento em glicerol 80% e o crescimento em placa contendo Kanamicina. A curva de crescimento das bactérias foi obtido por meio de plaqueamento e alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm. A leitura foi feita em leitor de microplacas (Spectromax M3, Molecular Devices Inc.). Após realizada todas essas etapas, uma concentração de 10^5 células por mL de salina foram administrados oralmente em animais IG e, após cinco dias, a mucosite foi induzida como descrito no item 4.3 (SANTOS *et al.*, 2011). No dia da eutanásia dos animais, suas fezes foram retiradas, plaqueadas e realizada coloração de Gram a fim de se confirmar a existência de um único morfotipo Gram negativo. Foram analisados os seguintes parâmetros: permeabilidade intestinal, infiltrado inflamatório por meio da dosagem de MPO no jejuno e concentração de SN-38 no fluido intestinal e no soro (Figura 10).

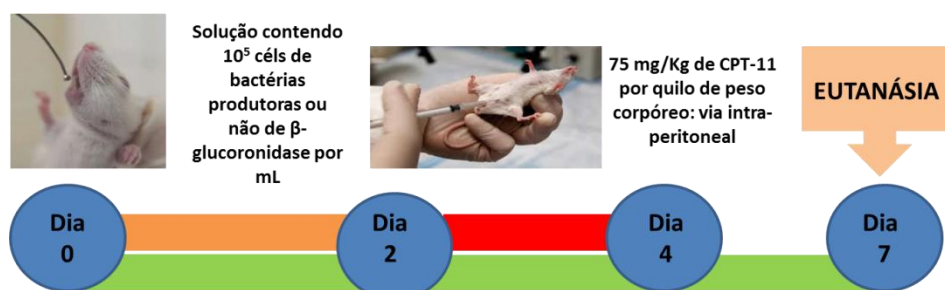


Figura 10: Esquema de monoassociação dos animais isentos de germes com as bactérias produtoras ou não de β -glucuronidase e indução de mucosite nos animais com salina ou CPT-11. Os círculos preenchidos em azul indicam a forma de contagem dos dias do experimento. A faixa verde indica o período

em que o experimento ocorreu, a faixa vermelha indica o período de indução de mucosite, enquanto a faixa laranja indica o período de monoassociação.

5

4.13. Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e analisados usando teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, E.U.A.) e consideradas significativas as diferenças que apresentaram $p \leq 0,05$.

10

5.0.RESULTADOS

5.1.Análises histopatológicas do fígado, baço e intestino delgado

5 Para as análises histológicas foram analisadas lâminas dos seguintes órgãos:
fígado, baço e intestino delgado de quatro animais de cada um dos grupos descritos no item
4.2.

5.1.2. Fígado e baço

10

 Como pode ser observado na figura 11, a indução de mucosite pelo CPT-11 não
alterou a estrutura histológica do fígado dos animais CV ou IG, havendo preservação do
parênquima hepático e ausência de focos inflamatórios. Também não foi observada
qualquer alteração histológica estrutural nas lâminas de baço. Tal característica histológica
15 no fígado foi acompanhada pelas dosagens das enzimas características dos infiltrados
inflamatórios (MPO, EPO e NAG) (dados não mostrados).

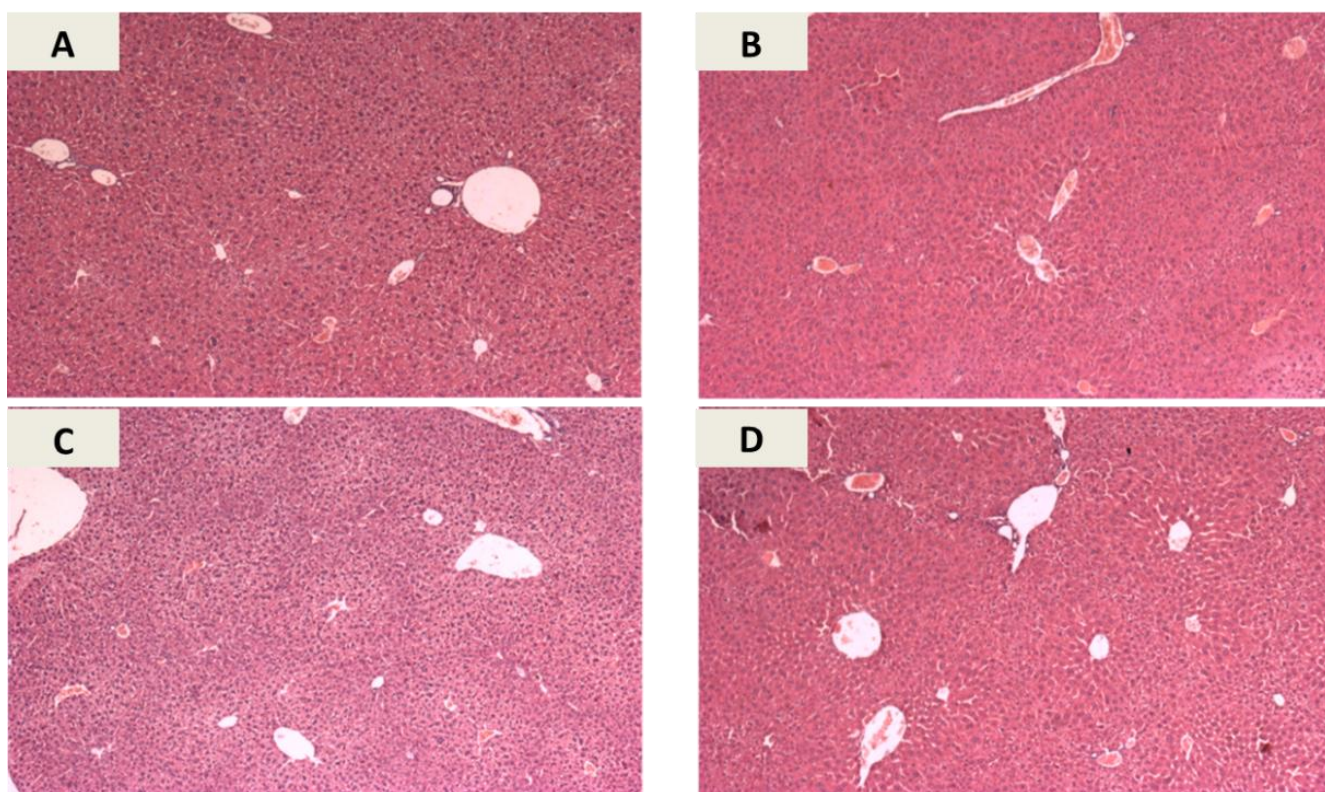


Figura 11: Fotomicrografias de fígado de camundongos saudáveis (A: CV/B: IG) e com indução de mucosite (C: CV + CPT-11/ D: IG + CPT-11) Coloração HE. Aumento: objetiva 4X. N = 4.

5.1.3. Intestino delgado (jejuno)

As fotos representativas das lâminas de jejuno (coradas por HE) de camundongos CV e IG saudáveis ou com indução de mucosite por CPT-11 podem ser observadas na figura 12. A indução de mucosite, nos animais convencionais, acarretou em alterações importantes na morfologia dessa porção intestinal como perda da estrutura da mucosa intestinal e consequente redução da espessura da mucosa. Além disso, houve intensa infiltração de células polimorfonucleares e mononucleares, alterações degenerativas de células epiteliais, perda de diferenciação celular mucossecretora e atipias precursoriais epiteliais (Figura 12 B). No entanto, a indução de mucosite, nos animais IG, não se mostrou tão grave como nos CV. Apesar da existência de áreas lesadas, com presença de edema e erosão superficial, o epitélio não apresentou alterações arquiteturais importantes e as estruturas de vilosidades foram bem preservadas quando comparados ao grupo CV com mucosite induzida (Figura 12 D).

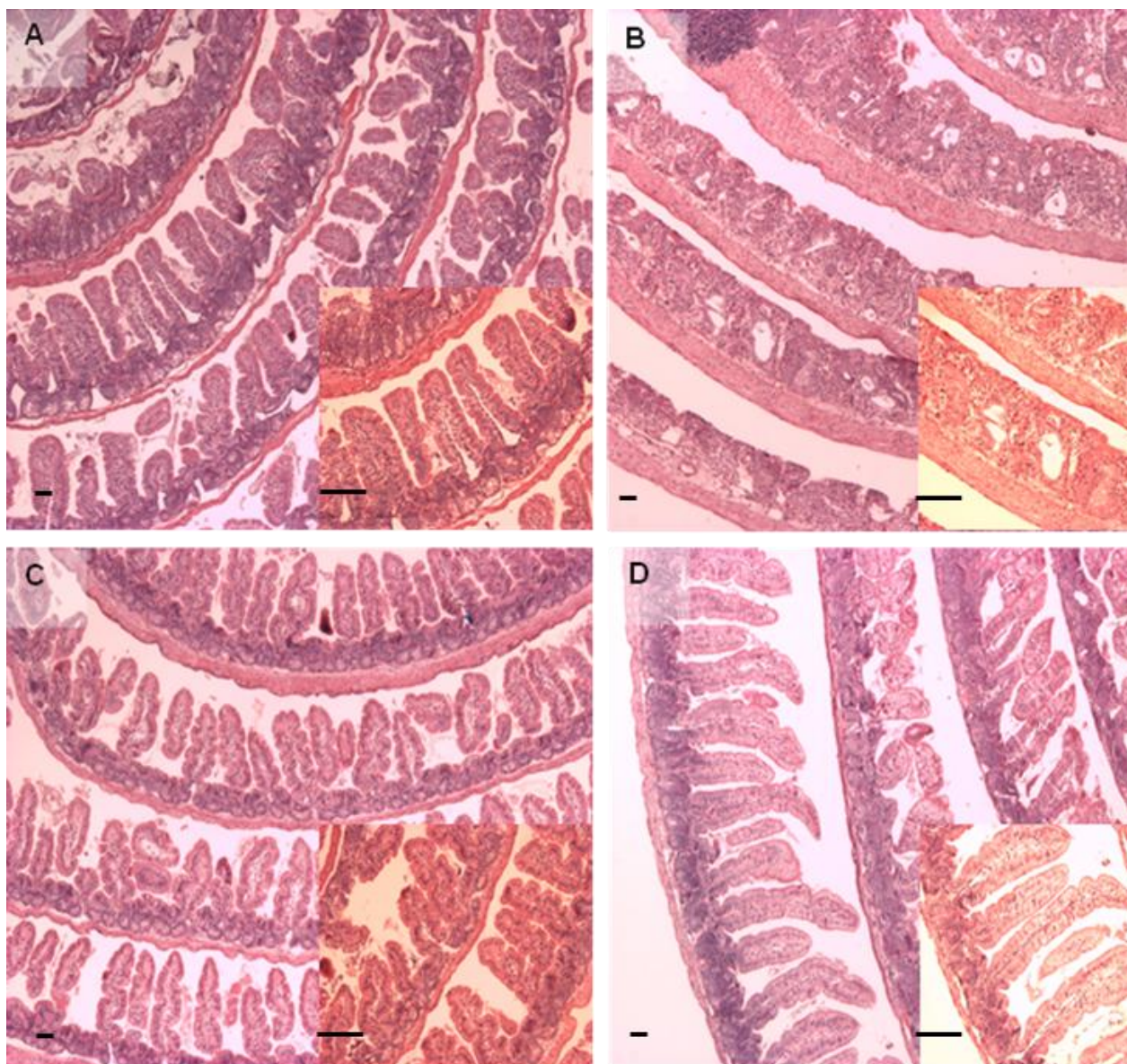


Figura 12: Fotomicrografias de jejuno de (A) camundongos convencionais saudáveis (B) camundongos convencionais com mucosite induzida (C) camundongos isentos de germes saudáveis (D) camundongos isentos de germes com mucosite induzida. O plano principal evidencia o aumento de 4x e em menor proporção o aumento de 10x. Coloração HE. Barra de escala = 20 μ m. Coloração HE. N = 4.

As fotos representativas das lâminas de jejuno coradas por PAS/AB podem ser observadas na figura 13. A indução de mucosite, nos animais CV, acarreta em uma diminuição do número de células caliciformes por área de mucosa, enquanto que, nos animais IG, há uma preservação dessas células em uma mesma área.

5

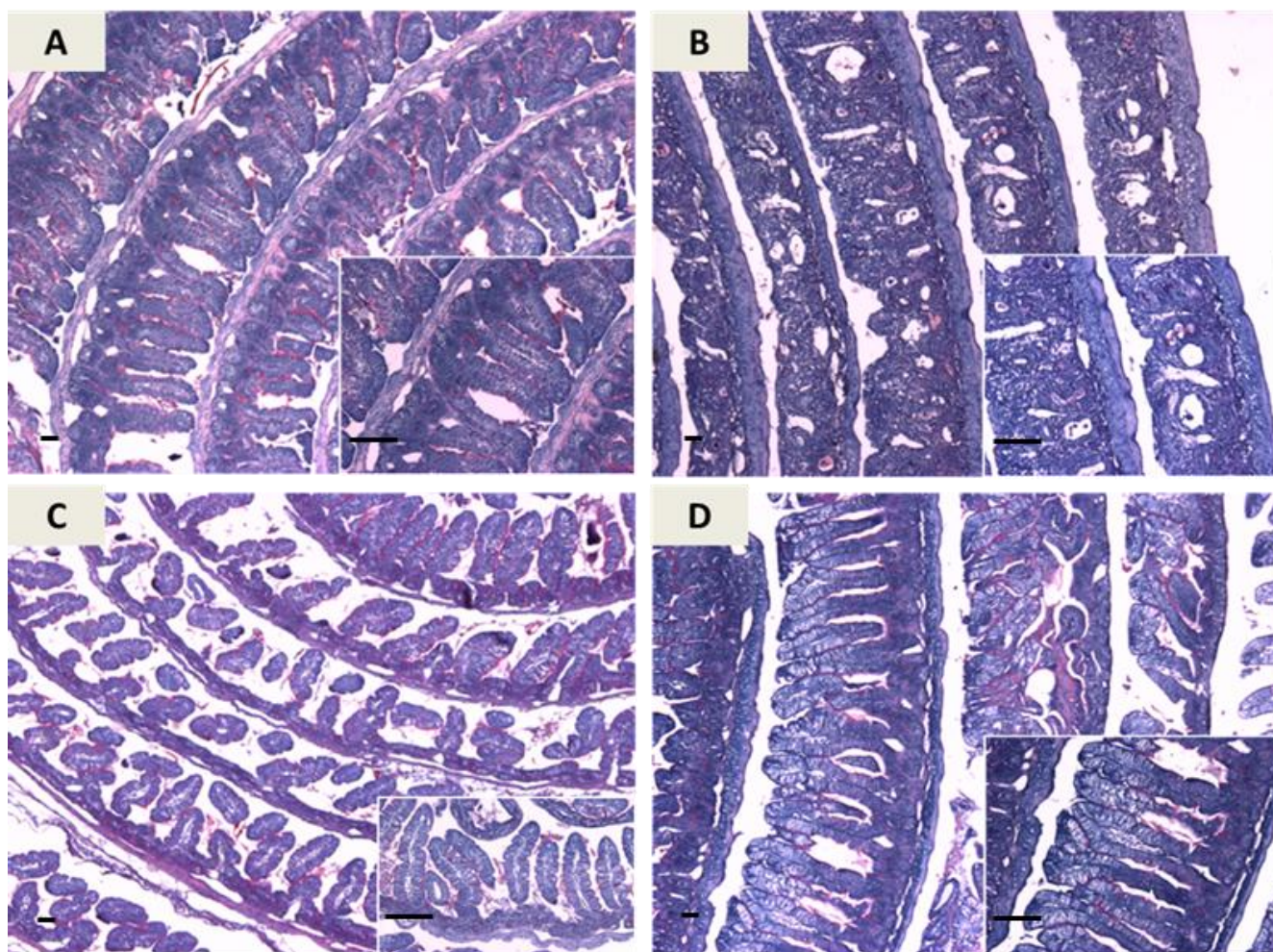


Figura 13: Fotomicrografias de jejuno de (A) camundongos convencionais saudáveis (B) camundongos convencionais com mucosite induzida (C) camundongos isentos de germes saudáveis (D) camundongos isentos de germes com mucosite induzida. Coloração PAS/Alcian Blue. O plano principal evidencia o aumento de 4x e em menor proporção o aumento de 10x. Coloração HE. Barra de escala = 20 μ m. N = 4.

10

15

As fotos representativas das lâminas de jejuno com Imuno-histoquímica para PCNA podem ser observadas na figura 14. A indução de mucosite, nos animais CV, acarreta em um aumento da proliferação celular presente no intestino, enquanto que, nos animais IG, há uma preservação da taxa de proliferação e a manutenção da região de proliferação presente na cripta.

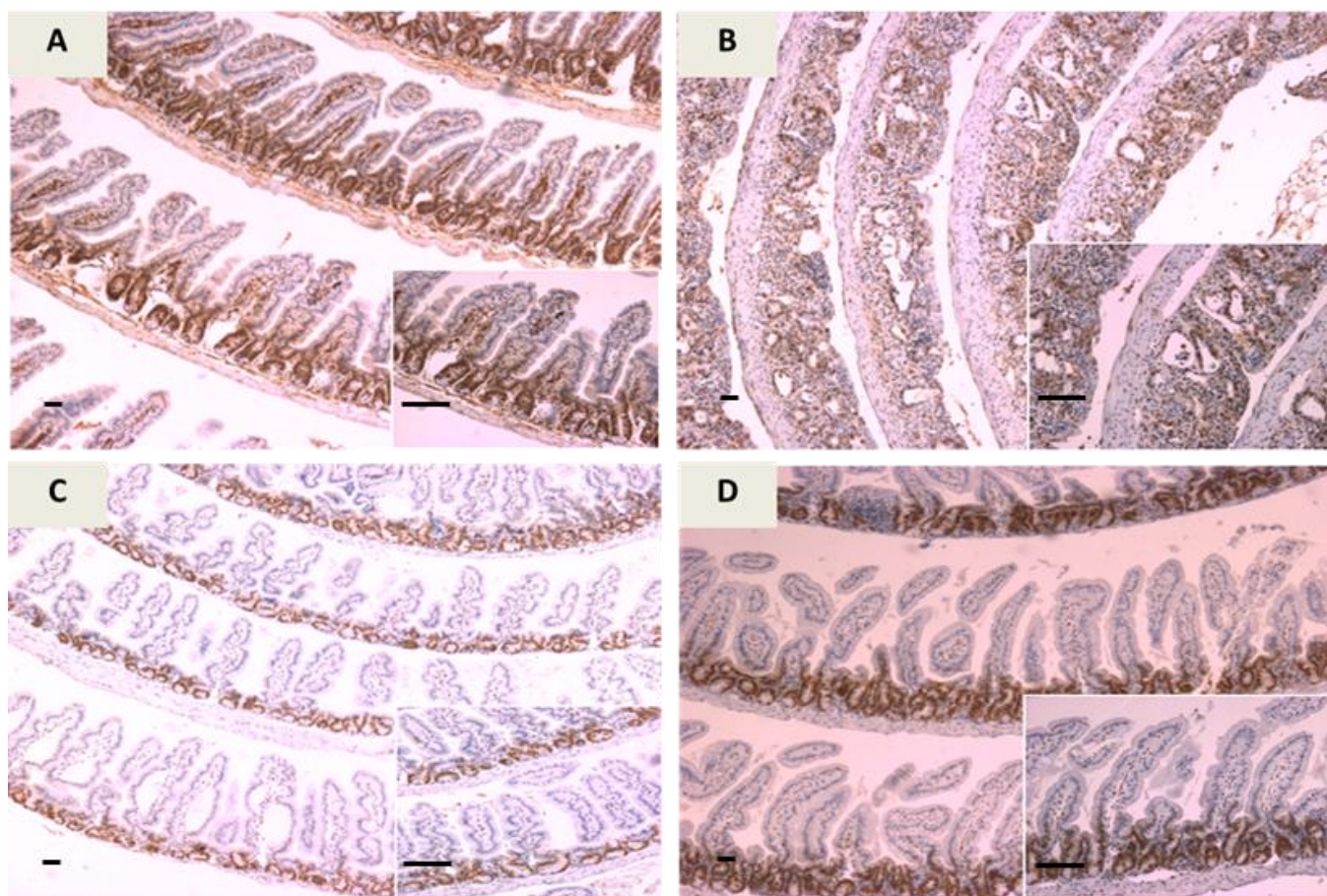


Figura 14: Fotomicrografias mostrando núcleos positivos para o anticorpo PCNA na mucosa intestinal do jejuno de camundongos Swiss. A) camundongos convencionais saudáveis (B) camundongos convencionais com mucosite induzida (C) camundongos isentos de germes saudáveis (D) camundongos isentos de germes com mucosite induzida. O plano principal evidencia o aumento de 4x e em menor proporção o aumento de 10x. Coloração HE. Barra de escala = 20 μ m. N = 4.

5.1.4. Análises morfométricas do jejuno

Com a finalidade de se quantificar o infiltrado inflamatório, a altura de vilosidades, número de células caliciformes e proliferação celular entre os grupos de animais CV e IG foi realizada a análise morfométrica das amostras das lâminas histológicas do jejuno (Figura 15).

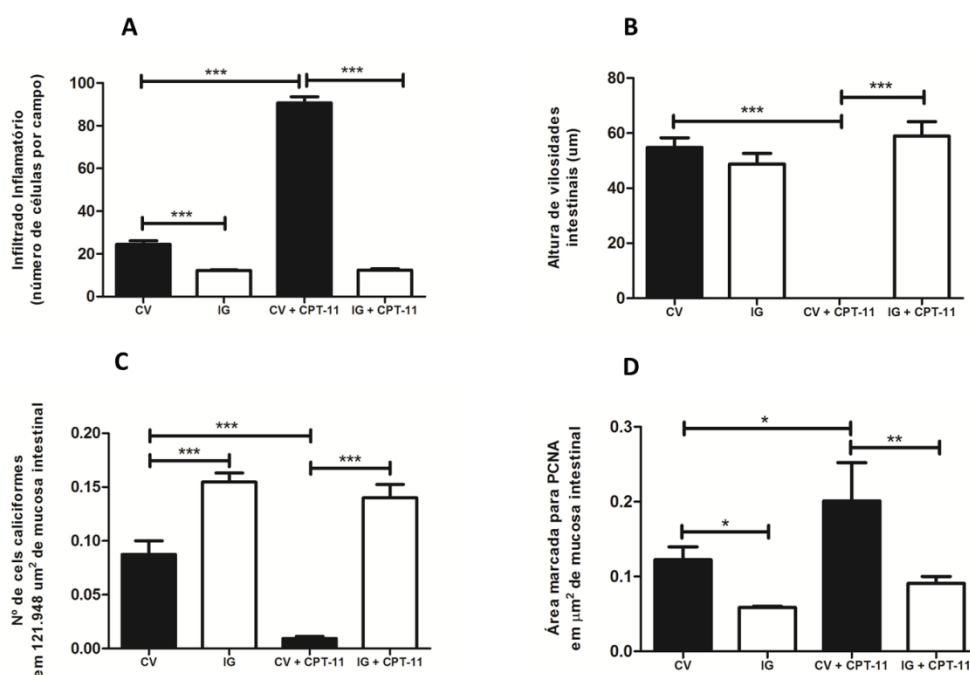


Figura 15: Morfometria do jejuno em termos de infiltrado inflamatório (A), altura de vilosidades (B), número de células caliciformes em área de mucosa intestinal (C) e área marcada para PCNA em área de mucosa intestinal (D). N = 4. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Como observado na figura acima, os animais CV com mucosite induzida por CPT-11 apresentam maior infiltrado inflamatório, menor altura de vilosidades intestinais, menor número de células caliciformes por área e maior área marcada para PCNA por área. Tais dados revelam uma maior destruição da mucosa intestinal no grupo de CV do que no grupo de IG, ambos com mucosite induzida. Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre os grupos de IG controle e experimental.

5.2.Determinação da permeabilidade intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal obtida pela medida da radioatividade do ^{99m}Tc -DTPA mostrou maior captação nos animais do grupo CV com mucosite induzida por CPT-11 do que no grupo IG com mucosite induzida (Figura 16). Os animais dos grupos controle e IG + CPT-11 mostraram níveis basais de captação do ^{99m}Tc -DTPA, indicando permeabilidade intestinal inalterada.

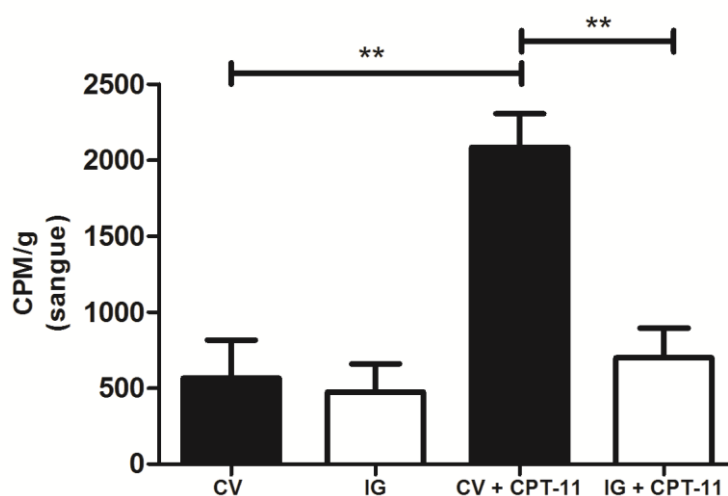


Figura 16: Avaliação da permeabilidade intestinal. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). $N = 5$.

5.3.Dosagem de sIgA no soro e no fluido intestinal

Observou-se um aumento da concentração de sIgA no soro dos animais do grupo dos animais CV com mucosite induzida quando comparado ao grupo dos animais IG. Este dado está de acordo com o resultado obtido na determinação de permeabilidade intestinal (Figura 17).

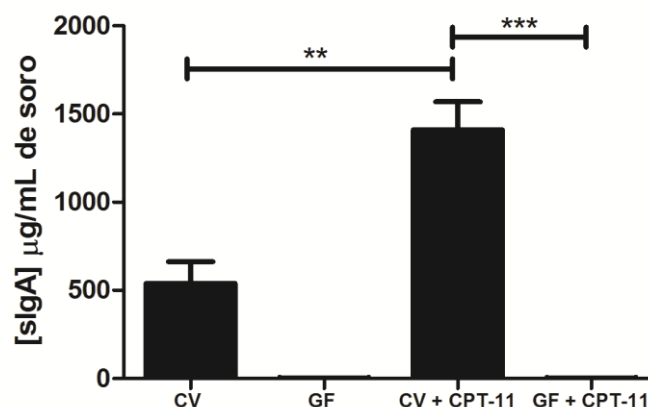


Figura 17: Avaliação da produção de sIgA. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

5

Observou-se uma redução na concentração de sIgA no fluido intestinal dos animais do grupo CV com mucosite induzida, quando comparado ao seu grupo controle. Observou-se, também, uma maior concentração de sIgA no fluido intestinal dos animais do grupo CV com mucosite induzida do que no grupo de animais IG com mucosite induzida (Figura 18).

10

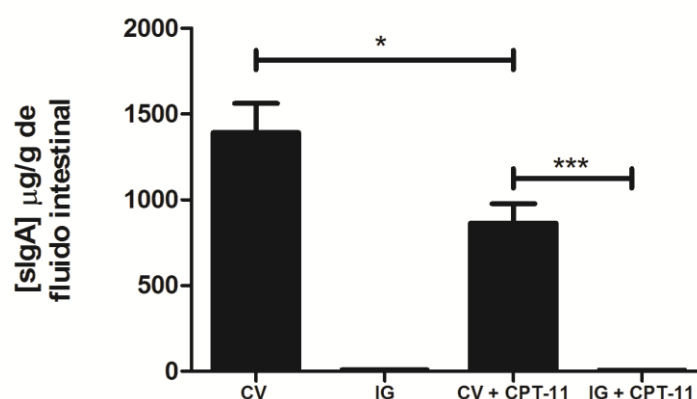


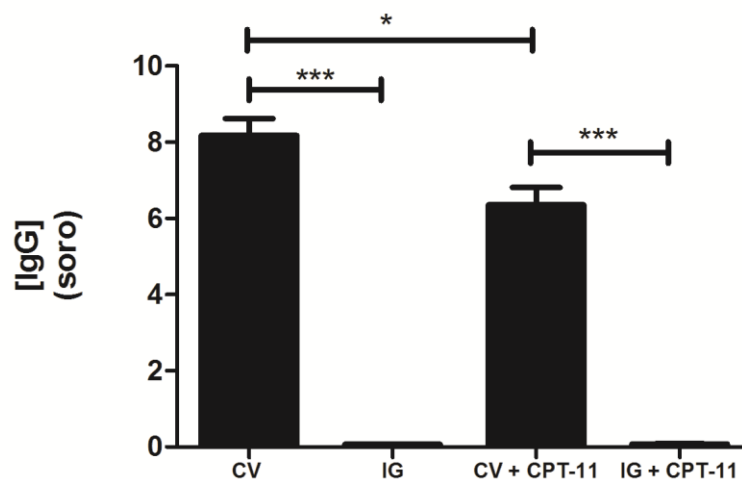
Figura 18: Avaliação da produção de sIgA. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

15

5.4. Dosagem de IgG no soro e no fluido intestinal

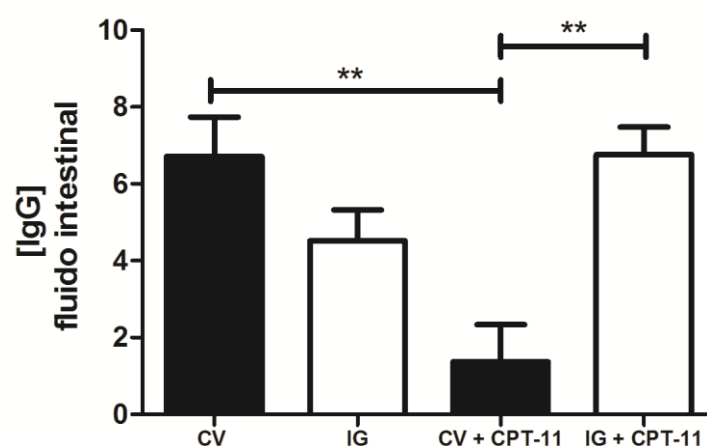
Observou-se uma redução na concentração de IgG no soro dos animais do grupo CV com mucosite induzida, quando comparado ao seu grupo controle. Observou-se,

também, uma maior concentração de IgG no grupo dos animais CV com mucosite induzida do que no grupo de animais IG com mucosite induzida (Figura 19).



5 **Figura 19:** Avaliação da concentração de IgG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

10 Observou-se uma redução na concentração de IgG no fluido intestinal dos animais do grupo CV com mucosite induzida, quando comparado ao seu grupo controle. Observou-se, também, uma maior concentração de IgG no grupo dos animais IG com mucosite induzida do que no grupo de animais CV com mucosite induzida (Figura 20).



15

Figura 20: Avaliação da concentração de IgG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

5.5. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG

5.5.1. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no jejuno

Observou-se que o grupo dos animais CV com mucosite induzida apresentou infiltrado inflamatório com níveis muito elevados de eosinófilos e neutrófilos (Figura 21B e A). O grupo de animais IG com mucosite induzida não apresentou tal perfil, não diferindo do seu grupo controle (Figura 21).

A avaliação da presença de macrófagos no jejuno (Figura 21C) não apresentou alterações significativas entre os diferentes grupos.

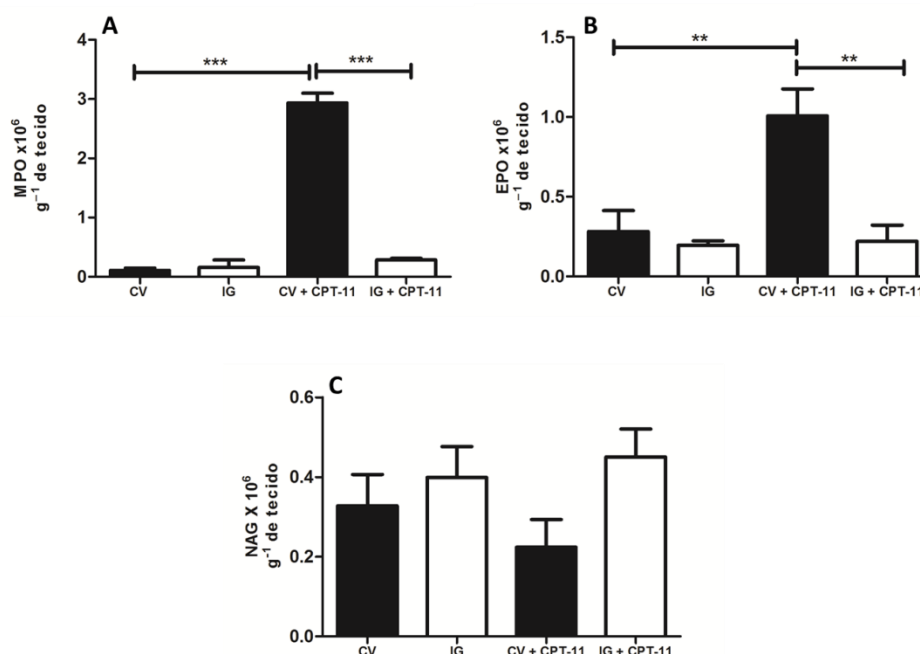


Figura 21: Avaliação quantitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no jejuno, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). N = 6.

5.5.2. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no cólon

Observou-se que o grupo dos animais CV com mucosite induzida apresentou infiltrado inflamatório com níveis muito elevados de neutrófilos (Figura 22 A). O grupo de animais IG com mucosite induzida não apresentou tal perfil, não diferindo do seu grupo controle (Figura 22). Quanto ao infiltrado de macrófagos, apenas observou-se diferença estatística entre os grupos de animais CV e IG controle (Figura 22 C).

A avaliação da presença de eosinófilos no cólon (Figura 22B) não apresentou alterações significativas entre os diferentes grupos.

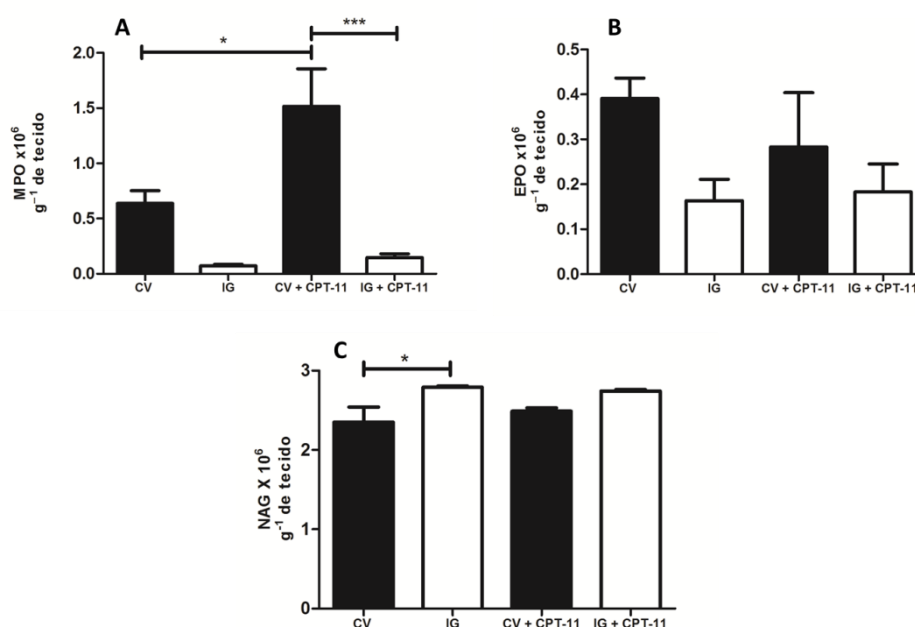


Figura 22: Avaliação quantitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no cólon, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). N = 6.

5.5.3. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no pulmão

Observou-se que o grupo dos animais CV com mucosite induzida apresentou infiltrado inflamatório com níveis muito elevados de neutrófilos (Figura 23A). O grupo de animais IG com mucosite induzida não apresentou tal perfil, não diferindo do seu grupo controle (Figura 23).

A avaliação da presença de eosinófilos e macrófagos no pulmão (Figura 23B e C) não apresentaram alterações significativas entre os diferentes grupos.

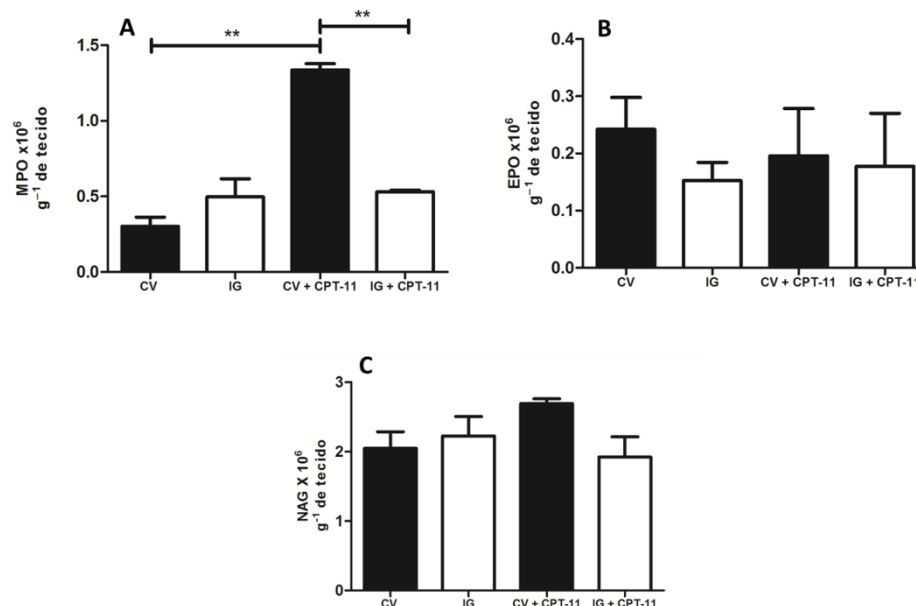


Figura 23: Avaliação quantitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no pulmão, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). N = 6.

5.6. Dosagem de citocinas no jejuno

Observou-se que o grupo dos animais CV com mucosite induzida apresentou aumento de produção de IL-1 β e TNF quando comparado ao grupo dos animais IG com mucosite induzida (Figura 24A e C). O grupo de animais IG com mucosite induzida não apresentou tal perfil, não diferindo do seu grupo controle (Figura 24).

Observou-se, também, que o grupo de animais IG possui uma grande produção de IL-10 quando comparado ao grupo de animais CV (Figura 24B).

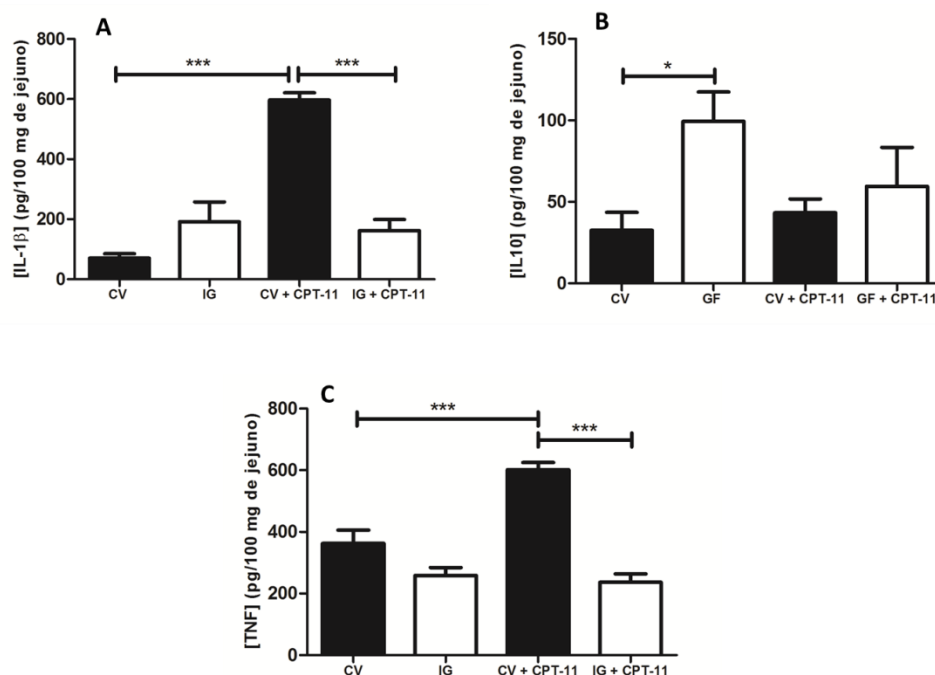


Figura 24: Quantificação de citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-10 e (C) TNF no jejuno. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. N = 6. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5

5.7.Determinação de SN-38 no fluido intestinal e no soro

Observou-se uma maior concentração de SN-38 no fluido intestinal do grupo dos animais IG quando comparado ao grupo dos animais CV. Nenhuma amostra apresentou

10 pico para o SN-38 no soro dos animais (Figura 25).

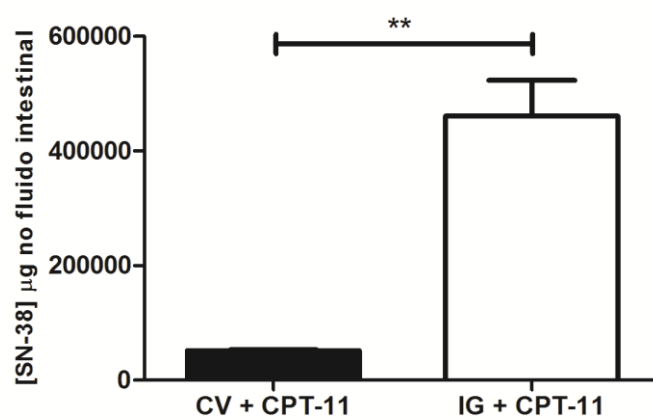


Figura 25: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal. Teste: *t* de student. N = 4. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

15

5.8.Reposição da microbiota intestinal

A fim de analisar se o fenótipo dos animais IG se alteraria a partir da reposição da microbiota, a administração de fezes foi realizada assim como descrito no item 4.11 e as análises foram repetidas. Buscou-se representar as diferenças estatísticas apenas entre o grupo CVO e os demais.

5.8.1.Fígado e baço

A indução de mucosite pelo CPT-11 também não alterou a estrutura histológica do fígado dos animais. Tal característica histológica no fígado foi acompanhada pelas dosagens das enzimas características dos infiltrados inflamatórios (dados não mostrados).

5.8.2. Intestino delgado (jejuno)

A foto representativa das lâminas de jejuno (coradas por HE) de camundongos CVO saudáveis ou com indução de mucosite por CPT-11 podem ser observadas nas figuras 26 A e B. A indução de mucosite, nos animais CVO, acarretou nas alterações percebidas nos animais CV, assim como descrito no item 5.1.3.

A foto representativa das lâminas de jejuno coradas por PAS/AB podem ser observadas na figura 26 C e D. A indução de mucosite, nos animais CVO acarretou nas alterações percebidas nos animais CV, assim como descrito no item 5.1.3.

A foto representativa das lâminas de jejuno com Imuno-histoquímica para PCNA podem ser observadas na figura 26 E e F. A indução de mucosite, nos animais CVO acarretou nas alterações percebidas nos animais CV, assim como descrito no item 5.1.3.

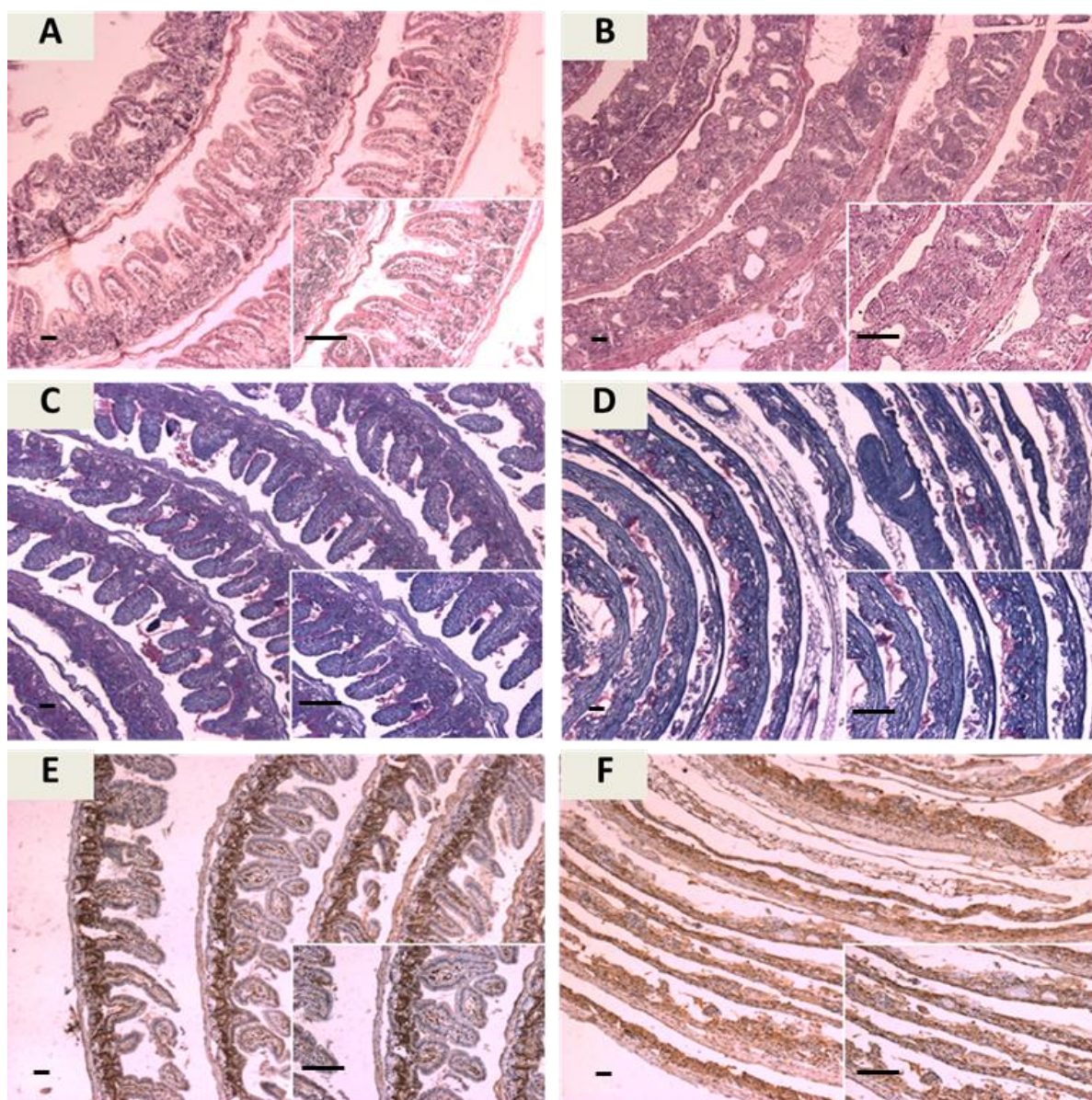


Figura 26: Fotomicrografias de jejuno de camundongos CVO controle (fotos à esquerda) e camundongos CVO com mucosite induzida (fotos à direita). Coloração: A e B: HE, C e D: PAS-Alcian Blue, E e F: Imuno-Histoquímica para PCNA. O plano principal evidencia o aumento de 4x e em menor proporção o aumento de 10x. Coloração HE. Barra de escala = 20 μm. Aumento: objetiva 4x e inserto 10x. N = 4.

5.8.3. Análises morfométricas do jejuno

Com a finalidade de se quantificar o infiltrado inflamatório, a altura de vilosidades, número de células caliciformes e proliferação celular entre os grupos de animais CVO foi realizada a análise morfométrica das amostras das lâminas histológicas do jejuno (Figura 27). Os dados obtidos para os animais CV e IG serão repetidos no gráfico a fim de se melhor visualizar a mudança de fenótipo visualizada no grupo CVO.

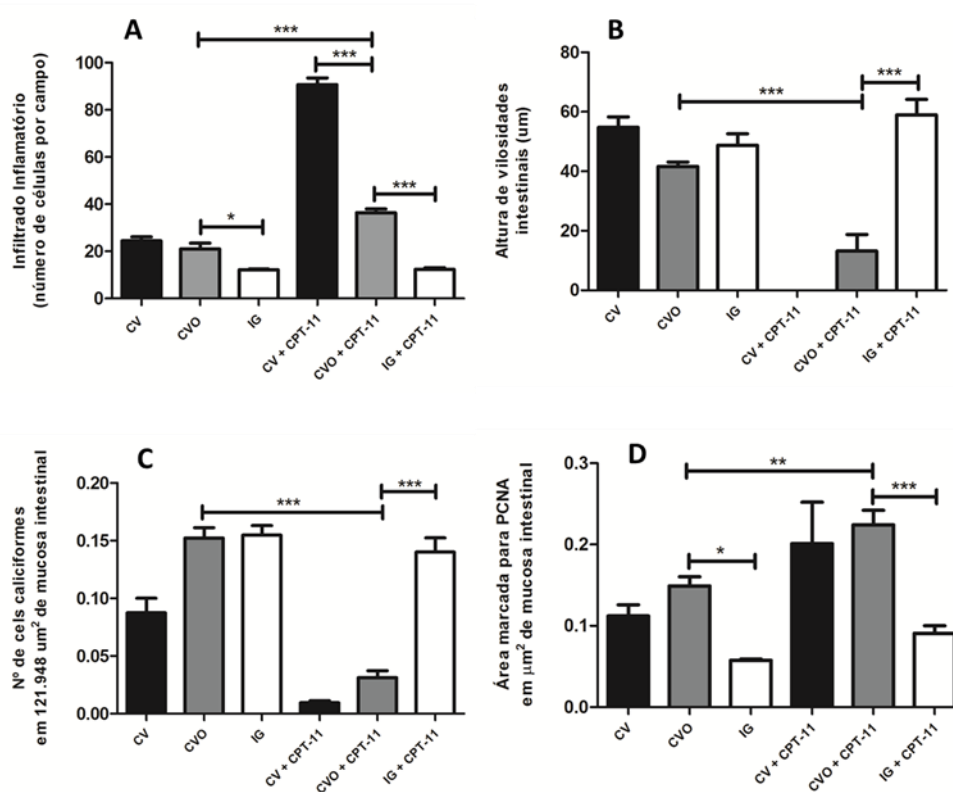


Figura 27: Morfometria do jejuno em termos de infiltrado inflamatório (A), altura de vilosidades (B), número de células caliciformes em área de mucosa intestinal (C) e área marcada para PCNA em área de mucosa intestinal. N = 4. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Como observado na figura acima, os animais CVO com mucosite induzida por CPT-11 apresentam características semelhantes as dos animais CV, exceto pelo parâmetro de infiltrado inflamatório, que atingiu valor menor do que o observado para o grupo dos animais CV, com mucosite induzida.

5.8.4. Determinação da permeabilidade intestinal

A avaliação da permeabilidade intestinal obtida pela medida da radioatividade do ^{99m}Tc -DTPA mostrou maior captação nos animais do grupo CVO com mucosite induzida por CPT-11, assim como no grupo de animais CV com mucosite induzida (Figura 28). Os animais dos grupos controle mostraram níveis basais de captação do ^{99m}Tc -DTPA, indicando permeabilidade intestinal inalterada.

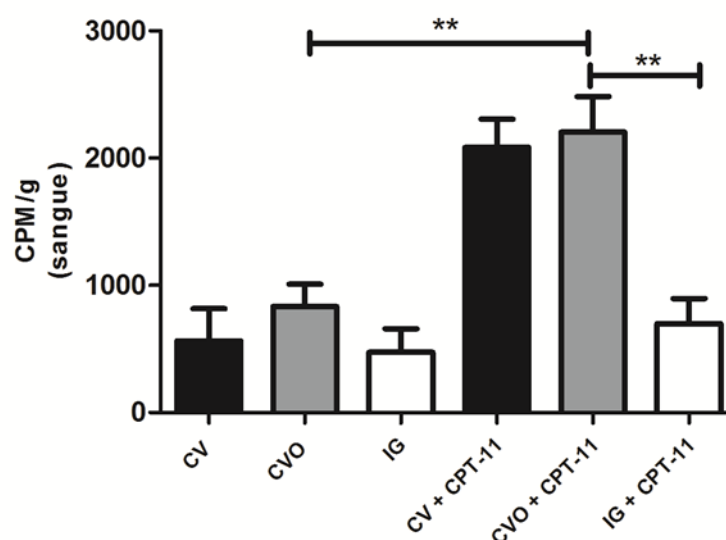


Figura 28: Avaliação da permeabilidade intestinal. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). N= 5.

5.8.5. Dosagem de sIgA no soro e no fluido intestinal

Observou-se que o grupo de animais CVO com mucosite induzida apresenta maior semelhança ao grupo dos animais IG, ambos com mucosite induzida (Figura 29).

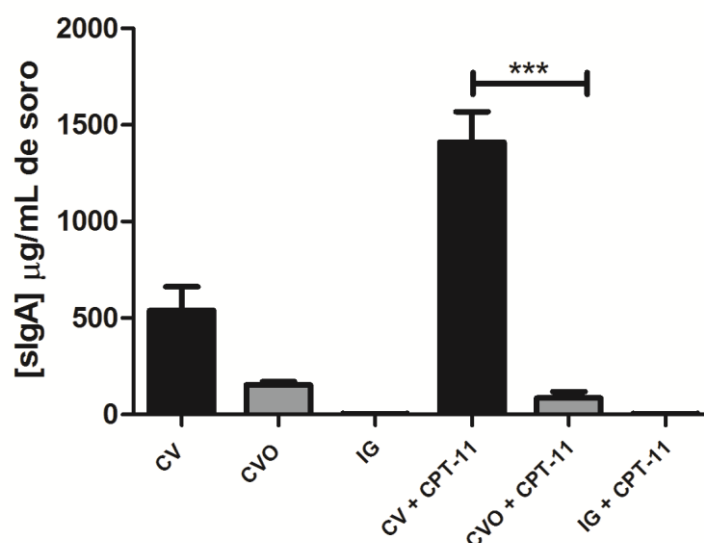


Figura 29: Avaliação da produção de sIgA. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

Observou-se uma redução na concentração de sIgA no fluido intestinal dos animais do grupo CVO com mucosite induzida, quando comparado ao seu grupo controle. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 30).

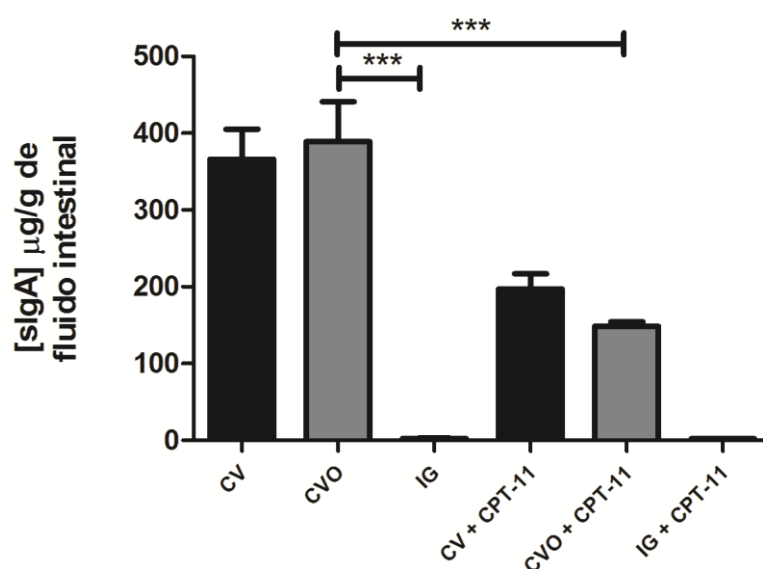
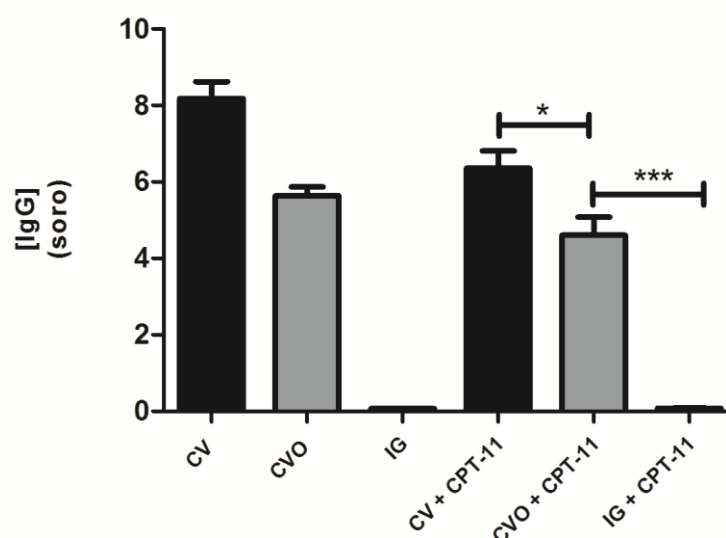


Figura 30: Avaliação da produção de sIgA. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

5.8.6. Dosagem de IgG no soro e no fluido intestinal

- 5 Observou-se, um perfil intermediário de concentração de IgG no soro dos animais do grupo CVO com mucosite induzida quando comparado ao grupo dos animais CV e IG com mucosite induzida (Figura 31).



- 10 **Figura 31:** Avaliação da concentração de IgG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

- Observou-se uma redução na concentração de IgG no fluido intestinal dos animais do grupo CVO com mucosite induzida, quando comparado ao seu grupo controle.
- 15 Observou-se, também, uma maior concentração de IgG no grupo dos animais IG com mucosite induzida do que no grupo de animais CVO com mucosite induzida. Perfil, este, semelhante, ao do grupo dos animais CV com mucosite induzida (Figura 32).

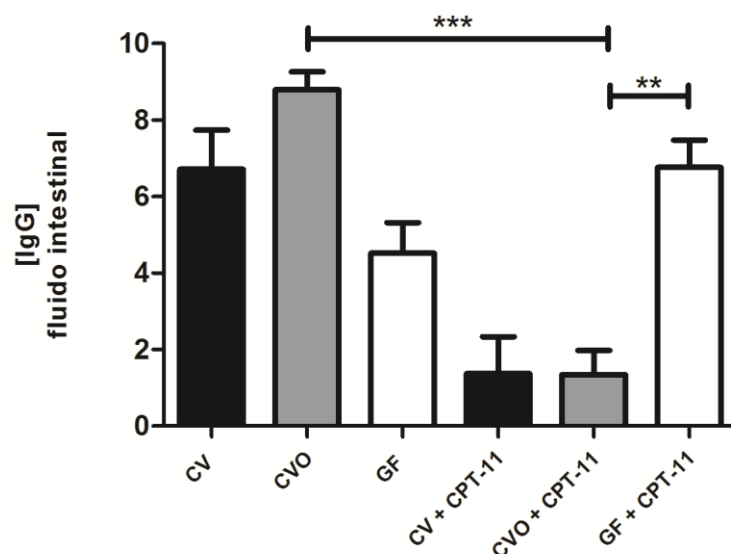


Figura 32: Avaliação da concentração de IgG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). N = 6.

5.8.7. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG

5.8.7.1. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no jejuno

Observou-se que o grupo dos animais CVO com mucosite induzida apresentou infiltrado inflamatório com níveis muito elevados de eosinófilos e neutrófilos (Figura 33 B e A). Perfil, este, semelhante ao do grupo CV com mucosite induzida.

A avaliação da presença de macrófagos no jejuno (Figura 33 C) não apresentou alterações significativas entre os diferentes grupos.

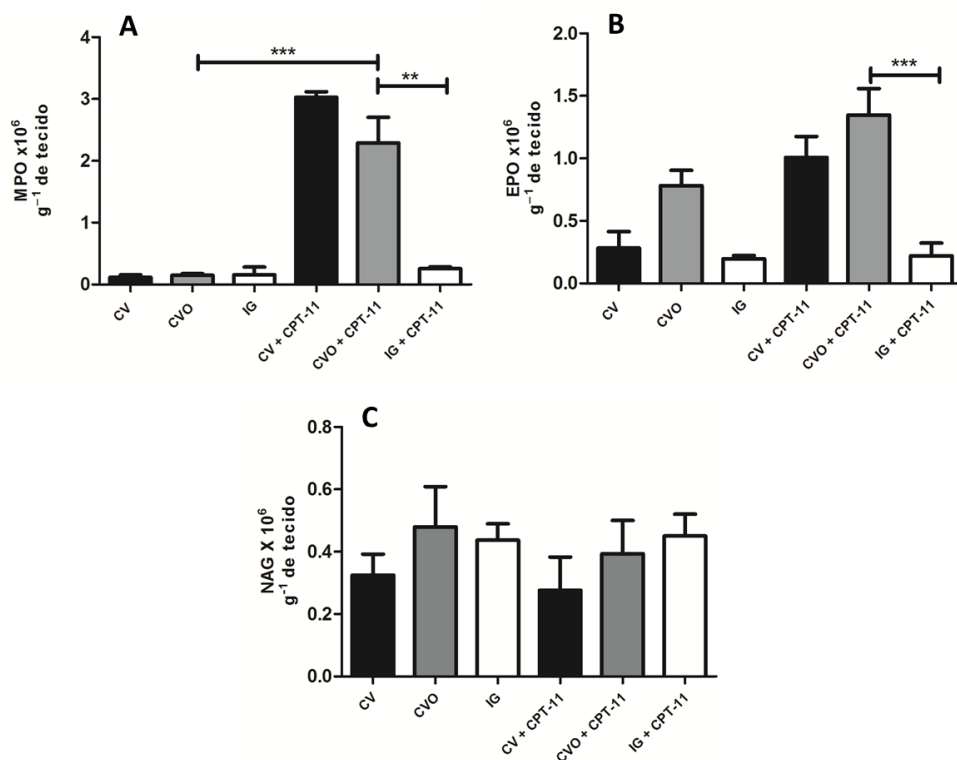


Figura 33: Avaliação quantitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no jejuno, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). N = 6.

5

5.8.7.2. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no cólon

Observou-se que o grupo dos animais CVO com mucosite induzida não apresentam infiltrado inflamatório com níveis muito elevados de neutrófilos ou macrófagos ou eosinófilos (Figura 34).

10

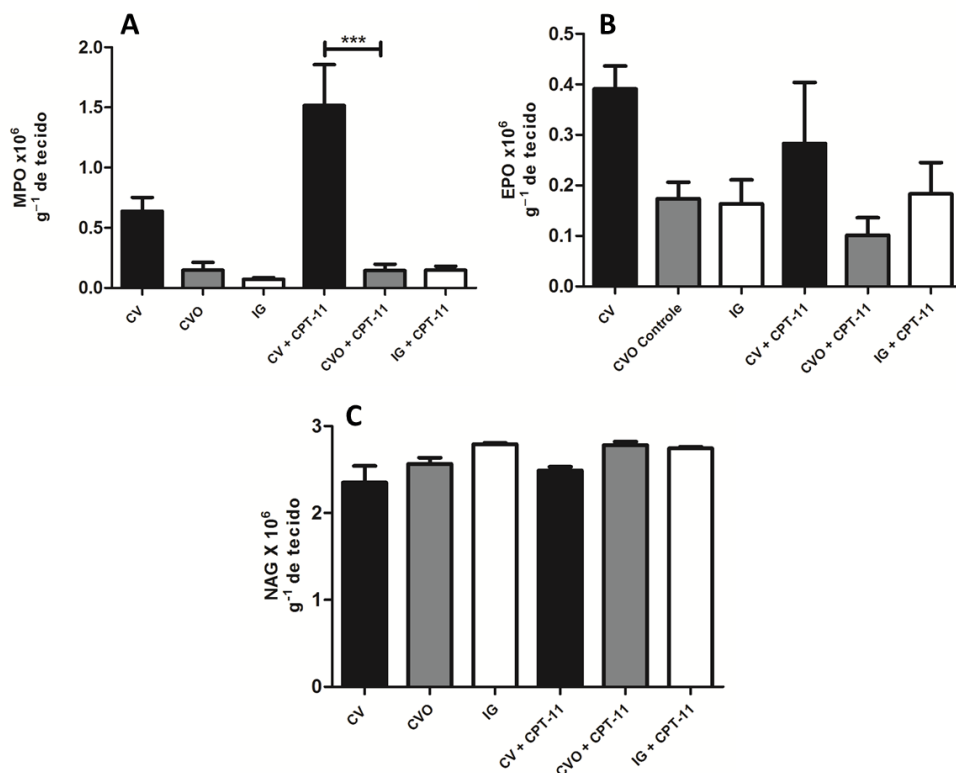


Figura 34: Avaliação quantitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no cólon, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). N = 6.

5

5.8.7.3. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no pulmão

Observou-se que o grupo dos animais CVO com mucosite induzida não apresentam infiltrado inflamatório com níveis muito elevados de neutrófilos ou macrófagos ou eosinófilos (Figura 35).

10

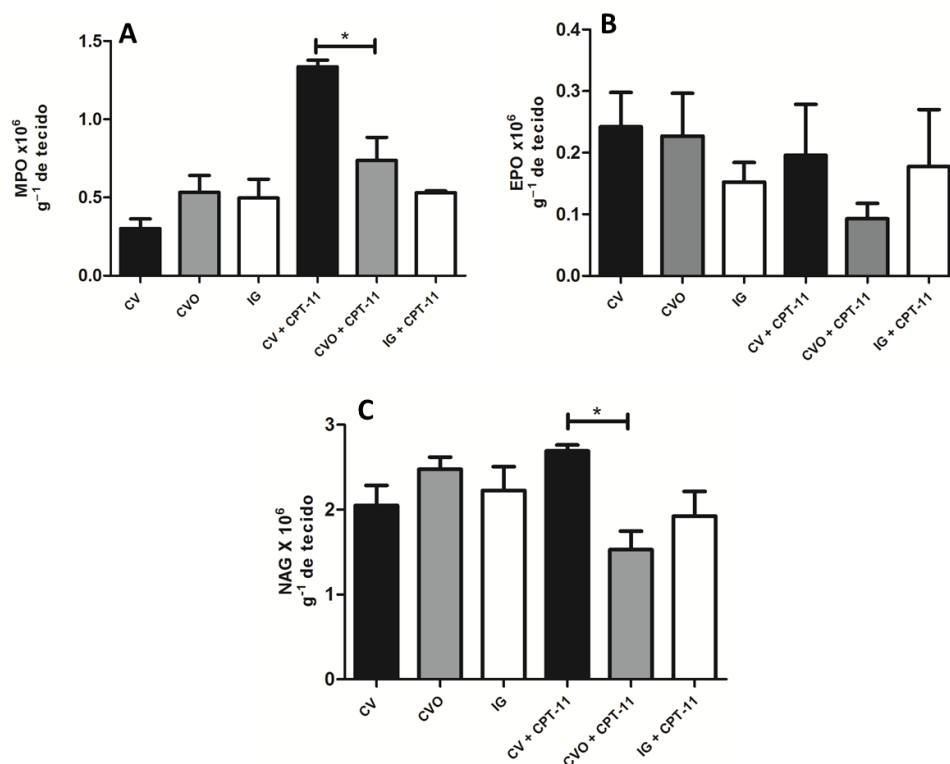


Figura 35: Avaliação quantitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no pulmão, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). $N = 6$.

5

5.8.8. Dosagem de citocinas no jejuno

Observou-se que o grupo dos animais CVO com mucosite induzida apresentou perfil intermediário entre o grupo de animais CV e IG com mucosite induzida para a produção de IL-1 β e TNF (Figura 36).

Observou-se, também, que o grupo de animais convencionalizados reverteu o fenótipo de alta produção da citocina IL-10 (Figura 36 C).

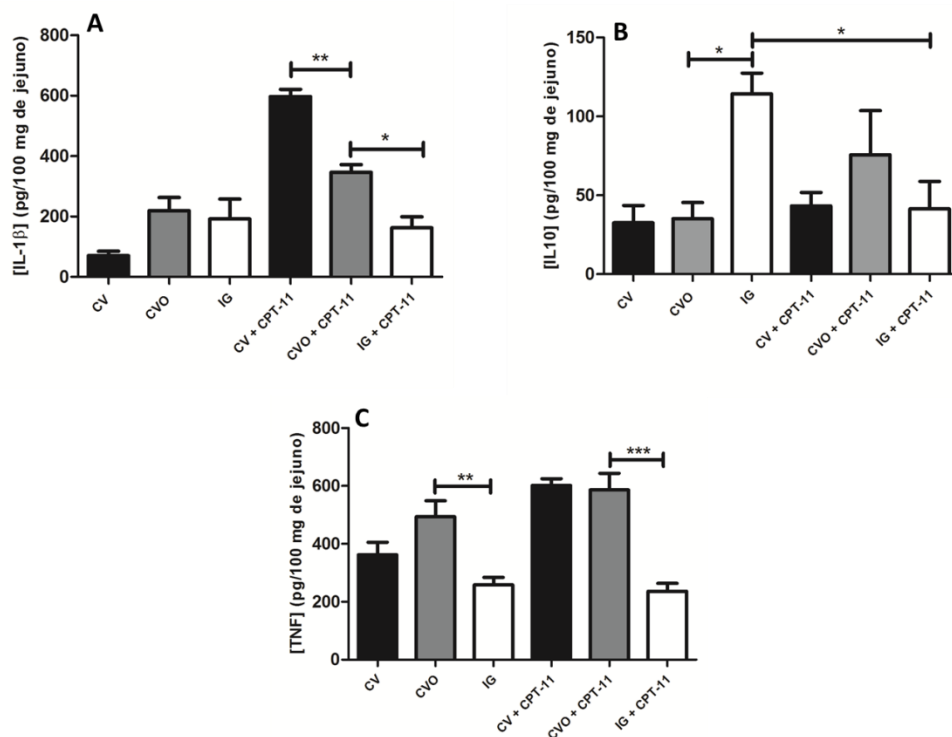


Figura 36: Quantificação de citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-10 e (C) TNF no jejuno. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. N = 6. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5

5.8.9. Determinação de SN-38 no fluido intestinal e no soro

Observou-se uma reversão no fenótipo dos animais IG quando foram colonizados pela microbiota de animais CV (Figura 37). Nenhuma amostra apresentou pico para o SN-38 no soro dos animais.

10

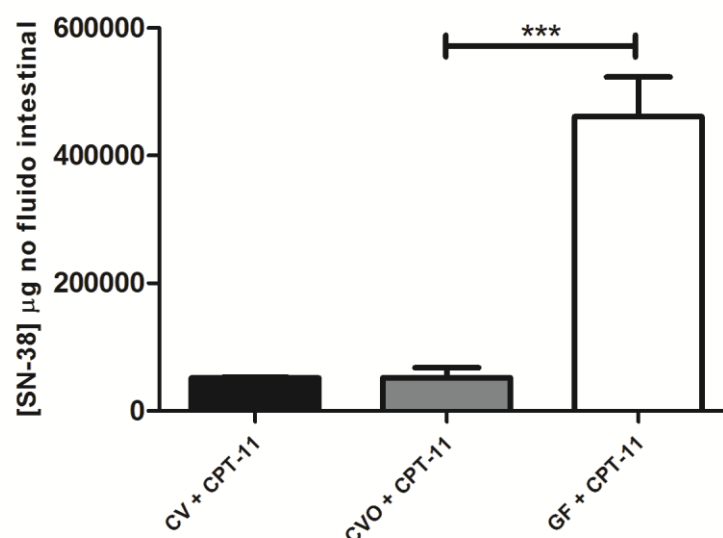


Figura 37: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey N = 4. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5

5.9. Indução de inflamação sistêmica por LPS

A fim de avaliar se os efeitos nefastos da microbiota seriam devido à indução e interação com sistema imunológico do animal, foi realizada a injeção de LPS via intra-peritoneal em camundongos IG, assim como descrito no item 4.12. Buscou-se representar as diferenças estatísticas apenas entre o grupo IG com LPS e os demais.

5.9.1. Fígado e baço

15

Como pode ser observado na figura 38, a indução de mucosite pelo CPT-11 também não alterou a estrutura histológica do fígado dos animais. Tal característica histológica no fígado foi acompanhada pelas dosagens das enzimas características dos infiltrados inflamatórios (dados não mostrados).

20

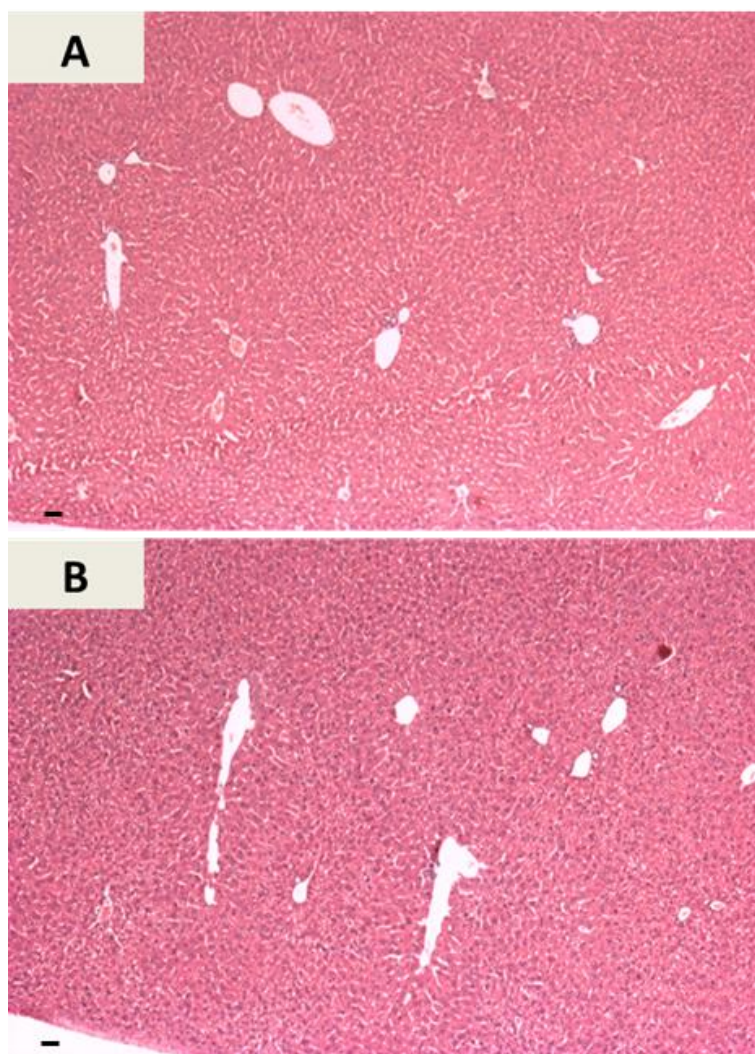


Figura 38: Fotomicrografias de fígado de camundongos IG + LPS (A) e IG + LPS com indução de mucosite (B). Coloração HE. Aumento: objetiva 4X. N = 4.

5

5.9.2. Intestino delgado (jejuno)

A foto representativa das lâminas de jejuno (coradas por HE) de camundongos IG com inflamação sistêmica induzida por LPS (IG+LPS) e com mucosite induzida por CPT-11 saudáveis ou com indução de mucosite por CPT-11 podem ser observadas nas figuras 39 A e B. A indução de mucosite, nos animais IG+LPS não acarretou nas alterações observadas nos animais CV: apesar da existência de áreas lesadas, com presença de edema e erosão superficial, o epitélio não apresentou alterações arquiteturais importantes e as estruturas de vilosidades foram bem preservadas.

A foto representativa das lâminas de jejuno coradas por PAS/AB podem ser observadas na figura 39 C e D. A indução de mucosite, nos animais IG+LPS acarreta em uma diminuição do número de células caliciformes por área de mucosa quando comparado ao seu grupo controle. No entanto, o grupo IG+LPS+CPT-11 apresenta menor redução do
5 número de células caliciformes por área de mucosa do que o grupo de animais CV ou CVO com mucosite induzida.

A foto representativa das lâminas de jejuno com Imuno-histoquímica para PCNA podem ser observadas na figura 39 E e F. A indução de mucosite, nos animais IG+LPS, acarreta em um aumento da proliferação celular presente no intestino. No entanto, não há
10 diferença estatística entre os grupos experimentais e o grupo IG+LPS.

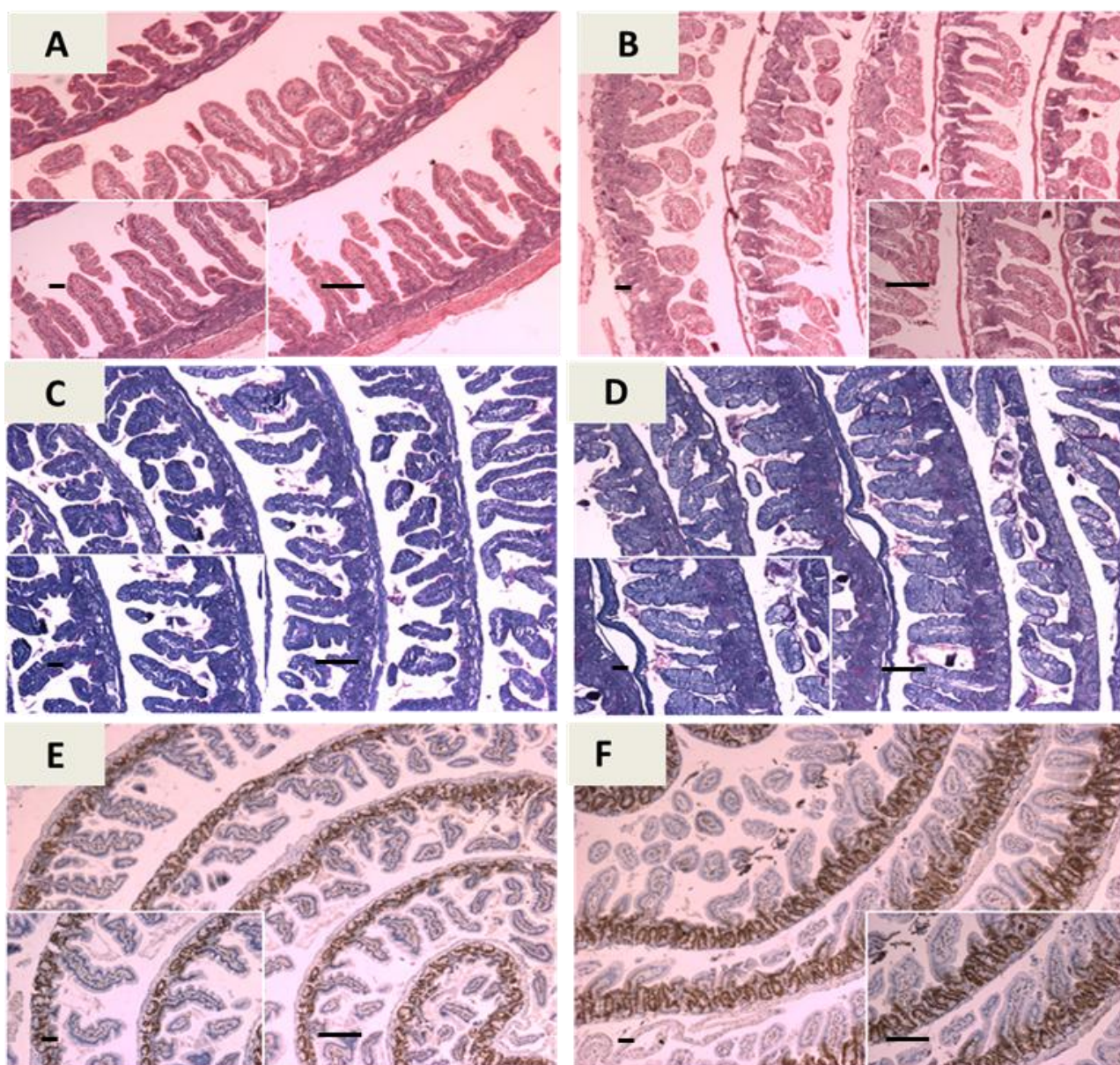


Figura 39: Fotomicrografias de jejuno de camundongos IG+LPS controle (fotos à esquerda) e camundongos IG+LPS com mucosite induzida (fotos à direita). Coloração: A e B: HE, C e D: PAS/Alcian Blue, E e F: Imuno-Histoquímica para PCNA. Aumento: objetiva 4X e inserto 10X. N = 4.

5.9.3. Análises morfométricas do jejuno

Com a finalidade de se quantificar o infiltrado inflamatório, a altura de vilosidades, número de células caliciformes e proliferação celular entre os grupos experimentais e o grupo IG+LPS foi realizada a análise morfométrica das amostras das lâminas histológicas do jejuno (Figura 40). Os dados obtidos para os animais CV, CVO e IG serão repetidos no gráfico a fim de se melhor visualizar a manutenção do fenótipo dos animais IG + LPS.

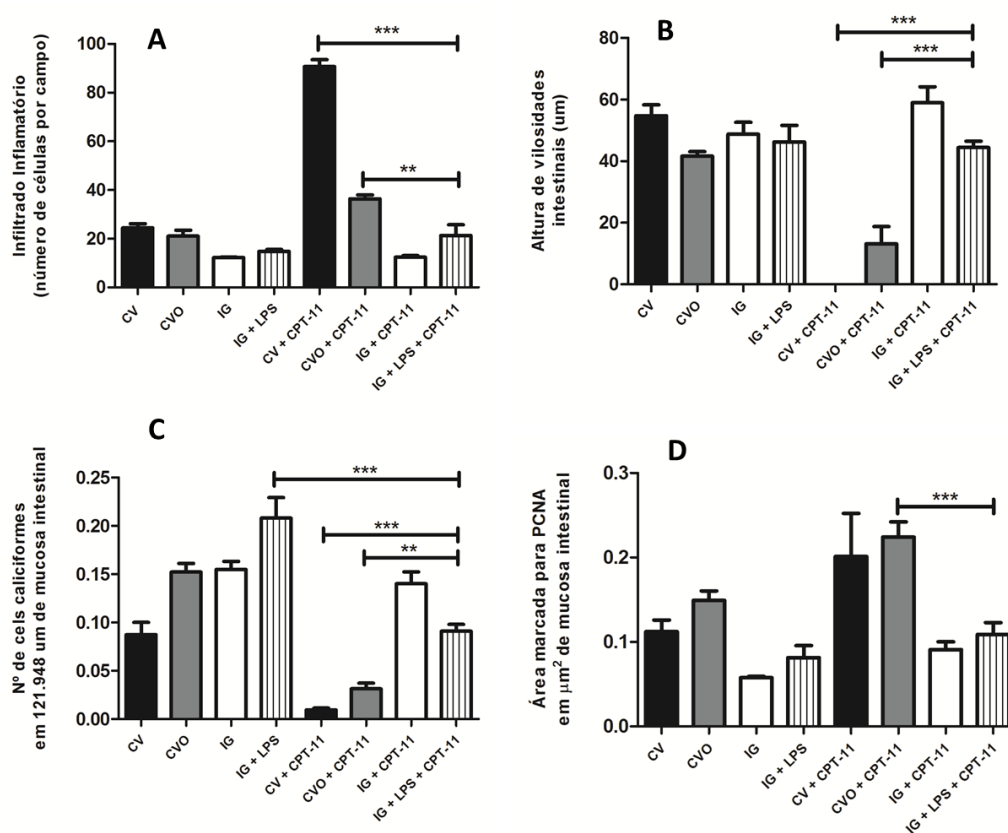


Figura 40: Morfometria do jejuno em termos de infiltrado inflamatório (A), altura de vilosidades (B), número de células caliciformes em área de mucosa intestinal (C) e área marcada para PCNA em área de mucosa intestinal (D). N = 4. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

Como observado na figura acima, os animais IG+LPS com mucosite induzida por CPT-11 apresentam características diferentes dos grupos CV ou CVO com mucosite induzida: menor infiltrado inflamatório, maior altura de vilosidades intestinais, maior número decélulas caliciformes por área e menor proliferação celular. Tais dados revelam uma

menor destruição da mucosa intestinal no grupo de animais IG + LPS com mucosite induzida.

5.9.4. Avaliação da presença de infiltrados de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos por meio da detecção de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG

5.9.4.1. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no jejuno

Observou-se que o grupo dos animais IG+LPS com mucosite induzida não apresentou infiltrado inflamatório com níveis elevados de eosinófilos e neutrófilos (Figura 41 B e A).

A avaliação da presença de macrófagos no jejuno (Figura 41 C) não apresentou alterações significativas entre os diferentes grupos.

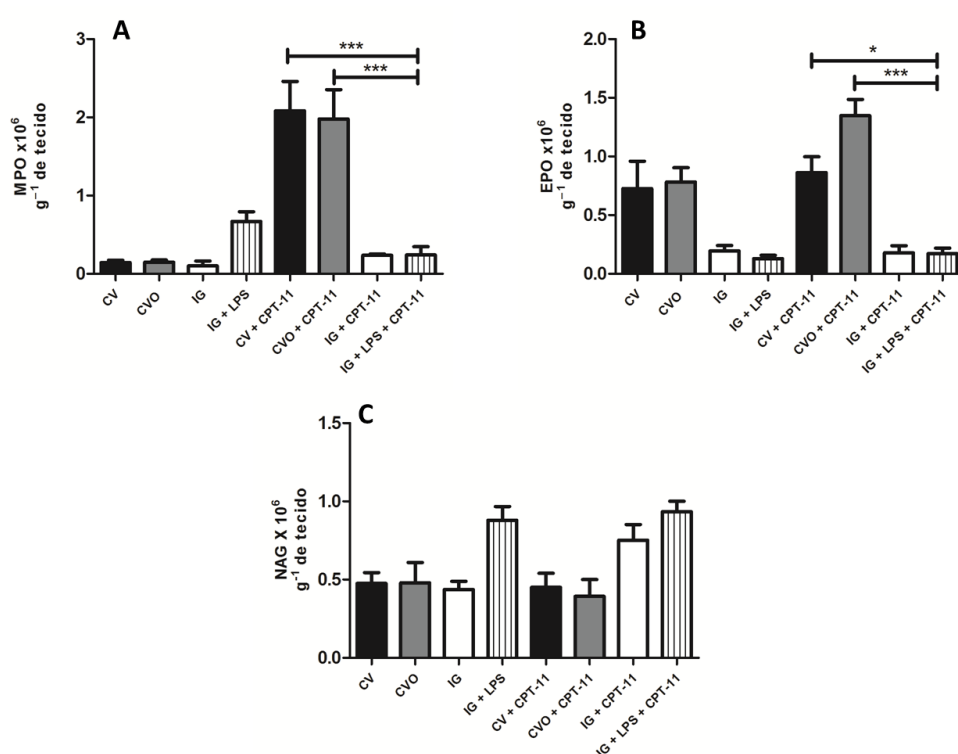


Figura 41: Avaliação quantitativa da presença de (A) neutrófilos, (B) eosinófilos e (C) macrófagos no jejuno, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO, EPO e NAG. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). N = 6.

5.9.5. Determinação de SN-38 no fluido intestinal e no soro

Observou-se uma maior concentração de SN-38 no fluido intestinal do grupo dos animais IG quando comparado ao grupo dos animais IG+LPS. Este último grupo, também teve concentrações de SN-38 maiores que dos grupos CV e CVO com mucosite induzida (Figura 42). Nenhuma amostra apresentou pico para SN-38 no soro dos animais.

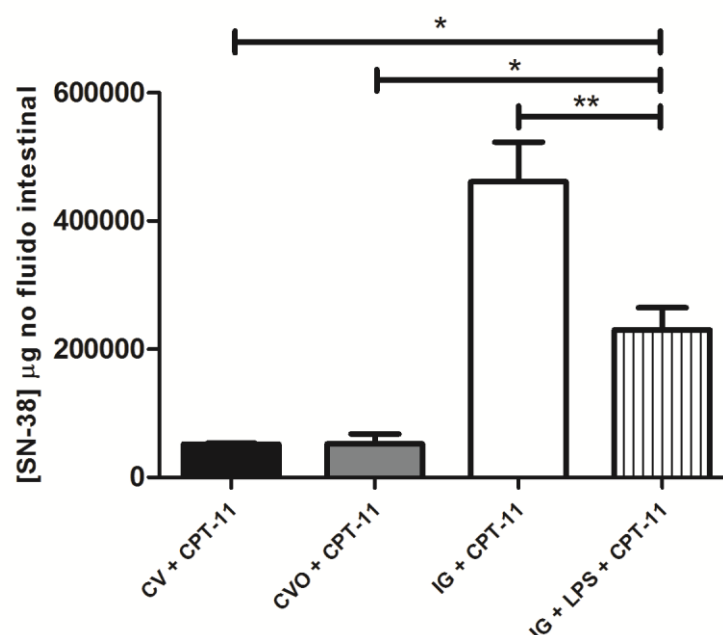


Figura 42: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal. Teste ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey N = 4. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5.10. Monoassociação de animais isentos de germes com bactéria não produtoras de β -glucuronidase e com bactéria produtora de β -glucuronidase

Com a finalidade de se verificar o papel da enzima β -glucuronidase no desenvolvimento de mucosite induzida por CPT-11, foi realizada a monoassociação de animais IG com bactérias produtoras da enzima ou não. Após a associação, a mucosite foi induzida como descrito no item 4.3 e algumas análises foram repetidas.

5.10.1. Determinação da permeabilidade intestinal

Observou-se que o grupo de animais IG monoassociados com bactéria produtoras de β -glucuronidase e com mucosite induzida apresenta aumento da permeabilidade intestinal quando comparado ao grupo de animais IG monoassociados com bactéria não produtoras de β -glucuronidase (Figura 43).

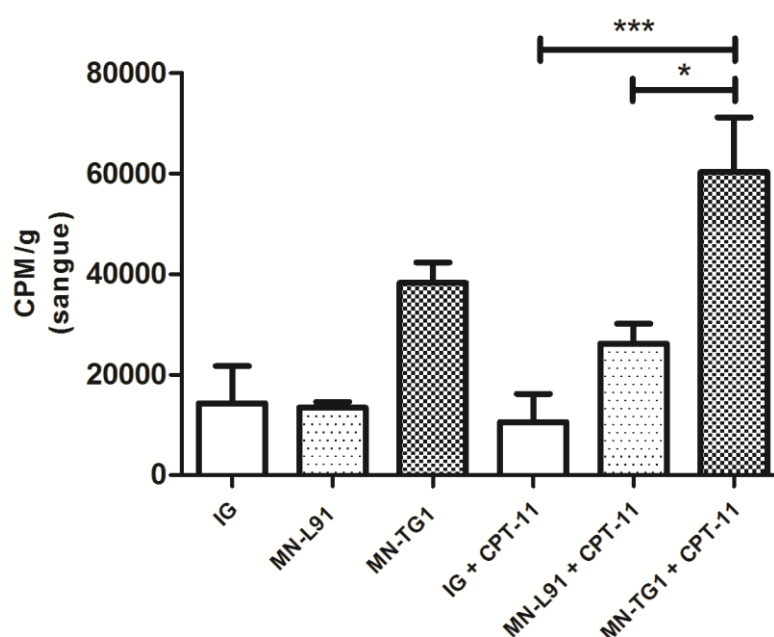


Figura 43: Avaliação da permeabilidade intestinal. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). N= 5.

5.10.2. Avaliação da presença de infiltrados inflamatórios no jejuno

Não se observou diferença significativa de infiltrados de neutrófilos no jejuno entre os grupos (Figura 44).

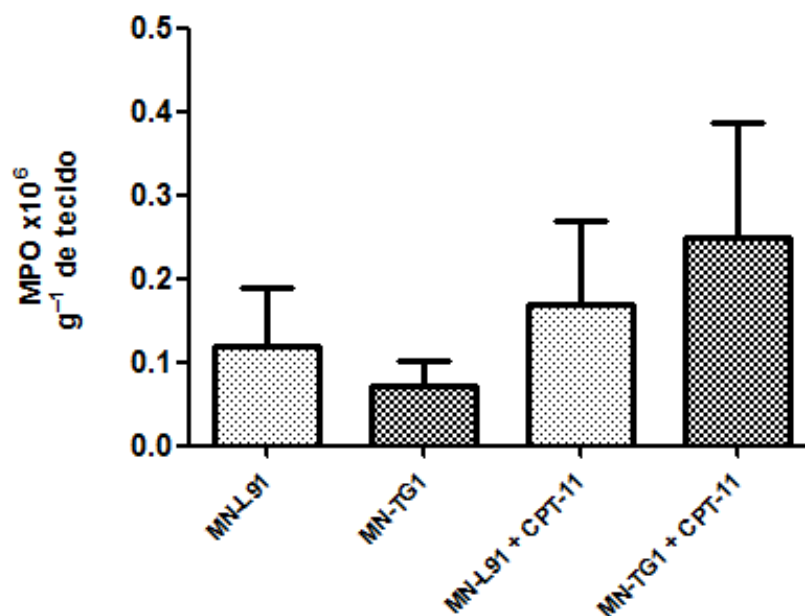


Figura 44: Avaliação qualitativa da presença de neutrófilos no jejuno, por meio da atividade de suas enzimas específicas MPO. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey. N = 5.

5

5.10.3. Determinação de SN-38 no fluido intestinal e no soro

Não se observou diferença significativa na concentração de SN-38 entre os grupos de animais IG monoassociados. Nenhuma amostra apresentou pico para SN-38 no soro dos animais (Figura 45)

10

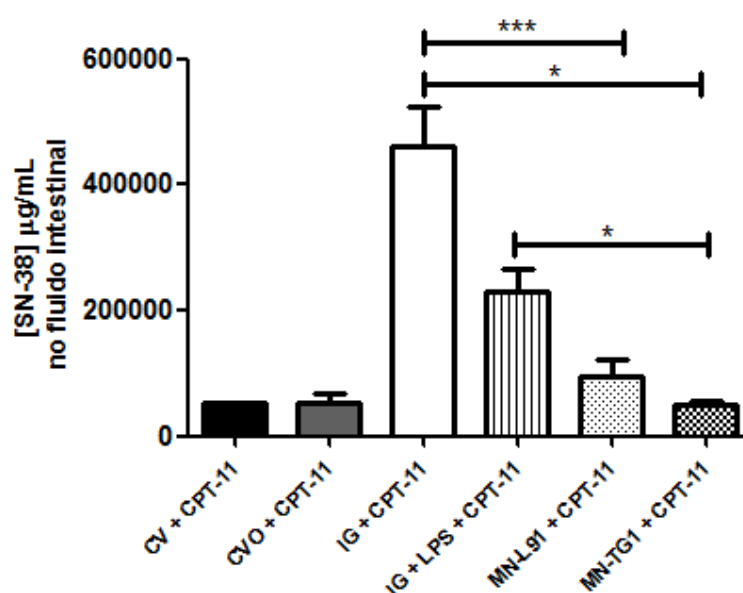


Figura 45: Quantificação de SN-38 no fluido intestinal. Teste: ANOVA one-away, seguido por post-test de Tukey N = 4. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

5.11. Resumo dos resultados

Análise histopatológica: Os animais não apresentaram danos no fígado ou no baço. No intestino delgado (jejuno), os animais CV com mucosite induzida por irinotecano apresentaram maior lesão no órgão quando comparados aos animais IG. Quando estes últimos receberam a microbiota intestinal de animais CV, o fenótipo visualizado foi revertido. O jejuno de animais IG com inflamação sistêmica induzida por LPS e que receberam CPT-11 não apresentaram lesões tão graves como observadas no grupo CV com mucosite induzida.

Permeabilidade: Os animais CV com mucosite induzida apresentaram maior permeabilidade intestinal do que os animais IG com mucosite induzida. Quando estes últimos receberam a microbiota intestinal de animais CV, o fenótipo visualizado foi revertido. Além disso quando os animais IG foram monoassociados com bactérias produtoras ou não de β -glucuronidase, percebeu-se uma maior permeabilidade no grupo de animais que receberam a bactéria produtora da enzima.

Produção de sIgA no soro e no fluido intestinal: Os animais CV com mucosite induzida apresentaram uma maior concentração de IgA no soro do que os animais IG com mucosite induzida. Fato, este, também observado para o fluido intestinal. No entanto, quando

analisamos a concentração de IgA no soro de animais CV controle e com mucosite induzida, percebe-se um aumento no grupo experimental, enquanto que no fluido intestinal, percebe-se uma redução. Quando os animais IG receberam a microbiota intestinal de animais CV e passaram pela indução de mucosite, o fenótipo visualizado para a concentração de IgA no soro não foi revertido, enquanto houve alteração na concentração dessa imunoglobulina no fluido.

Produção de IgG no soro e no fluido intestinal: Os animais CV com mucosite induzida apresentaram maiores níveis de IgG no soro do que os animais IG com mucosite induzida. Fato, este, que não foi observado para o fluido intestinal: os animais CV com mucosite induzida apresentaram redução quando comparados aos animais IG com mucosite induzida. No entanto, quando analisamos os níveis de IgG no soro e no fluido intestinal de animais convencionais controle e com mucosite induzida, percebe-se uma redução no grupo experimental. Quando os animais IG receberam a microbiota intestinal de animais CV e passaram pela indução de mucosite, o fenótipo visualizado foi revertido.

Dosagem de MPO, EPO e NAG:

Jejuno: Verificou-se a presença de infiltrado de neutrófilos e eosinófilos no jejuno do grupo CV com mucosite induzida, enquanto que os animais IG não apresentaram o mesmo perfil. Quando os animais IG receberam a microbiota intestinal de animais CV e passaram pela indução de mucosite, o fenótipo visualizado foi revertido. A inflamação sistêmica induzida por LPS não foi capaz de alterar o fenótipo visualizado nos animais IG com mucosite induzida. Não foi observada diferença significativa para os grupos monoassociados.

Cólon: Verificou-se a presença de infiltrado de neutrófilos no cólon do grupo CV com mucosite induzida, enquanto que os animais IG não apresentaram o mesmo perfil. Quando os animais IG receberam a microbiota intestinal de animais CV e passaram pela indução de mucosite, o fenótipo visualizado não foi revertido.

Pulmão: Verificou-se a presença de infiltrado de neutrófilos no pulmão do grupo CV com mucosite induzida, enquanto que os animais IG não apresentaram o mesmo perfil. Quando os animais IG receberam a microbiota intestinal de animais CV e passaram pela indução de mucosite, o fenótipo visualizado não foi revertido.

Dosagem de citocinas: Verificou-se que o grupo dos animais CV com mucosite induzida apresentou maior concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF) no jejuno quando comparado ao grupo dos animais IG com mucosite induzida. Por outro lado, os

animais IG apresentaram uma grande produção de citocina anti-inflamatória (IL-10) de forma basal. Quando os animais IG receberam a microbiota intestinal de animais CV e passaram pela indução de mucosite, o fenótipo visualizado foi revertido.

Determinação de SN-38 no fluido intestinal: Verificou-se que os animais IG com mucosite induzida apresentaram uma maior concentração de SN-38 no fluido intestinal do que os animais CV com mucosite induzida. Quando os animais IG receberam a microbiota intestinal de animais CV e passaram pela indução de mucosite, o fenótipo visualizado foi revertido. No entanto, quando os animais IG receberam LPS via intra-peritoneal, não houve alteração fenotípica observada levando em consideração este parâmetro. Além disso, não foi observada diferença significativa para os grupos monoassociados.

6.0.DISSCUSSÃO

A mucosite está relacionada à toxicidade de muitos quimioterápicos e radioterápicos utilizados no tratamento do câncer. Estudos clínicos revelam que o CPT-11 associa-se com a incidência de mais de 20% de mucosite intestinal grave, podendo chegar até 40% dos pacientes (FILHO *et al.*, 2010).

Neste trabalho, objetivamos avaliar o papel da microbiota intestinal no desenvolvimento e gravidade de mucosite induzida por CPT-11 em animais. Sabe-se das limitações do modelo murino, que não apresenta a complexidade da doença humana, mas são ferramentas importantes e indispensáveis para o estudo do envolvimento dos diferentes fatores (genéticos, ambientais e imunológicos) na patogênese de diversas doenças, entre elas a mucosite.

Primeiramente, trabalhamos com quatro grupos: os grupos de animais CV e IG controle e os grupos de animais CV e IG com mucosite induzida por CPT-11. As principais características histopatológicas descritas na literatura, como: atrofia do epitélio (com perda da arquitetura), diminuição de vilosidades intestinais e infiltração de células inflamatórias (GIBSON *et al.*, 2006; LOGAN *et al.*, 2008; STRINGER *et al.*, 2009), foram observadas apenas no grupo dos animais CV com mucosite induzida. Nosso trabalho também verificou redução do número de células caliciformes e aumento da taxa de proliferação celular por área de mucosa nos animais CV com mucosite induzida, quando comparado ao seu grupo controle. Stringer (2008) também relatou um menor número de células caliciformes no jejuno de ratos com mucosite induzida por 5-FU, enquanto Bowen *et al.* (2007) não encontraram diferença significativa entre os grupos controle e experimental de ratos com mucosite induzida por CPT-11.

Sabe-se que as células epiteliais de todo TGI sofrem maturação estrutural e enzimática ao moverem-se da zona proliferativa (onde se localizam as células estaminais ou tronco) para a zona de diferenciação, provendo população celular funcional para cada região do TGI (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Como o quimioterápico provoca lesões na estrutura epitelial, nossa hipótese seria que as células não conseguiriam se diferenciar e, portanto, justificaria a redução do número de células caliciformes encontradas em nosso trabalho.

Ademais, nosso modelo demonstrou um aumento da atividade proliferativa do animal CV controle para o CV com mucosite induzida. Tal taxa de proliferação aumentada

poderia ser justificada como uma tentativa do epitélio de se reconstruir. No entanto, a taxa de destruição celular parece ser maior do que essa tentativa de replicação, fazendo com que encontremos o fenótipo observado nas análises histológicas. Todavia, este aumento de proliferação aumentaria a afinidade do quimioterápico ao epitélio intestinal, levando a um ciclo de destruição. A utilização de moléculas que regulem de forma negativa a proliferação celular intestinal – como o fator de crescimento β -3- teve bons resultados contra a mucosite em hamsters. Sonis *et al.* (1997) relataram diminuição da gravidade, duração de sintomas, redução de perda de peso e aumento da taxa de sobrevivência dos animais.

Os animais IG com mucosite induzida não apresentaram lesões tão graves como aquelas visualizadas nos animais CV também com mucosite induzida. Nosso dado é corroborado pelo resultado de Brandi *et al.* (2006) que demonstraram que a dose letal de CPT-11 para ratos IG é três vezes maior do que para os ratos CV. Tal dado revela que o quimioterápico testado é mais tóxico para os animais CV do que para os IG.

Outra característica importante na mucosite é o aumento da permeabilidade intestinal. Em estudos realizados por Choi *et al.* (2007) e Melichar *et al.* (2001) houve uma maior permeabilidade intestinal em humanos com mucosite induzida por 5-FU quando comparado ao grupo controle. Em estudo realizado em ratos por Carneiro-Filho *et al.* (2004), também foi observado rompimento da camada epitelial do intestino e, consequente aumento da permeabilidade intestinal. Nosso resultado, para os animais CV, está de acordo com o descrito acima, uma vez que também apresentaram aumento da permeabilidade intestinal. No entanto, para o grupo de animais IG, essa característica não foi observada. Em estudo realizado por Heyman *et al.* (1987), envolvendo análise de aumento de permeabilidade intestinal em camundongos IG e CV durante infecção por Rotavírus, percebeu-se que os animais IG tiveram permeabilidade aumentada, assim como os CV infectados com o vírus.

O que parece ser plausível aferir após análise dos resultados para os animais IG é que o fenótipo visualizado nesse grupo de animais seria vantajoso quando o estudo envolve doenças de fundo inflamatório, como as DII e a mucosite. No entanto, quando o estudo envolve infecções, como já relatados por Fagundes *et al.* (2012) – avaliando infecção por *Klebsiella pneumoniae* em animais IG -, esse perfil se torna desvantajoso, uma vez que o braço inflamatório, que não é visualizado nesses animais, seria de extrema importância para a defesa do hospedeiro contra o patógeno invasor.

Em trabalho realizado por Souza *et al.* (2004), foi observado uma grande produção preferencial de IL-10 pelos macrófagos dos camundongos IG. A produção inata dessa interleucina trocava o perfil inflamatório (de produção de citocinas e infiltrado de células inflamatórias) visualizado nos animais CV, e que seria responsável pelo dano tecidual e letalidade, para um perfil hiporresponsivo visualizado nos animais IG.

Outra característica reconhecidamente diferente entre animais CV e IG é a produção de sIgA (MARTINS *et al.*, 2007). Essa imunoglobulina atua como uma primeira barreira que limita o acesso de antígenos intestinais à corrente sanguínea e controla a população microbiana (PABST, 2012). Em animais CV, as células produtoras de sIgA estão presentes constitutivamente no tecido linfóide associado à mucosa, que é indicativo da atividade imunológica nesses locais. A formação dessas células requer estimulação microbiana (PABST, 2012). Dessa forma, já era esperado uma baixa concentração de sIgA no fluido intestinal dos animais IG. Quando se comparou os dois grupos CV - controle e experimental - observou-se redução na concentração de sIgA no segundo grupo citado. A possível hipótese para essa observação seria que como a mucosa intestinal está sendo completamente destruída pela ação do quimioterápico, as células produtoras de sIgA também estariam sendo lesadas e, com isso, não haveria secreção da imunoglobulina para o lumen intestinal, e sua concentração, por consequência, reduzir-se-ia. Esta hipótese pode ser confirmada por estudo publicado por Matthias *et al.* (1997), que relataram diminuição da produção e secreção de IgA no ambiente intestinal como resultado de destruição da mucosa realizada pelo bacilo *Tropheryma whippelii*, agente etiológico da doença de Whipple.

Foi de nosso interesse também avaliar a concentração de IgA no soro dos animais. Como a IgA é produzida pelas células plasmáticas epiteliais e, estas secretam a imunoglobulina no lúmen, o encontro de IgA no soro poderia ser relacionado ao aumento de permeabilidade intestinal, uma vez que ela sairia do ambiente de origem e atingiria a corrente sanguínea (PABST, 2012).

Outra imunoglobulina de extrema importância, uma vez que é a mais abundante e a que apresenta maior meia-vida no corpo (SCHROEDER & CAVACINI, 2010) e que também foi avaliada no nosso estudo foi a IgG, tanto no soro como no fluido intestinal. Segundo estudo realizado por Ohwaki *et al.* (1977), o nível de IgG no soro de camundongos IG jovens (com 8 semanas) é baixo, mas tende a aumentar com a idade. Como utilizamos animais de 6 a 8 semanas, nossos resultados estão de acordo com este

observado por Ohwaki e colaboradores. Quando os dois grupos de animais CV – controle e experimental – foram comparados, houve uma redução na produção de IgG no último grupo. Nosso resultado está de acordo com dado obtido por Brown *et al.* (1976), que também encontrou níveis baixos de IgG no soro de pacientes submetidos a radioterapia.

5 Com relação à IgG no fluido intestinal, observou-se uma alta concentração dessa imunoglobulina no grupo dos animais IG. Em estudo de avaliação do desenvolvimento de proteínas séricas e tecidos linfoides em animais IG, foi encontrado o mesmo aumento gradual de IgG com a idade observado por Ohwaki e colaboradores (WOSTMANN, 1996). Esses autores concluíram, então, que antígenos presentes na dieta são importantes fontes de
10 estimulação do tecido linfóide, e por consequência, produção de IgG no ambiente intestinal. Nossos resultados estão de acordo com os resultados observados pelos pesquisadores, uma vez que os animais IG apresentaram elevados níveis de IgG no fluido intestinal. Quando os dois grupos de animais CV – controle e experimental – foram comparados, houve uma redução na produção de IgG no último grupo. Tais dados revelam
15 uma debilitação da imunidade sistêmica ocasionada pelo quimioterápico nos animais CV por meio da redução da produção de IgG.

Outra característica marcante da mucosite é a inflamação presente no tecido intestinal. A fim de avaliar a constituição dos infiltrados inflamatórios, realizamos experimentos para dosagem de enzimas específicas dos tipos celulares neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (MPO, NAG e EPO, respectivamente). A atividade de MPO é
20 reconhecidamente uma medida indireta do influxo de neutrófilos para o tecido inflamado. Estudos envolvendo análise de mucosite oral induzida por 5-FU demonstraram um aumento da atividade de MPO no tecido de animais doentes (Melo *et al.*, 2007), que demonstraram aumento da atividade dessa enzima em animais com mucosite induzida por
25 CPT-11. Tais resultados corroboram com os nossos achados para os animais CV com mucosite induzida, que também apresentaram aumento significativo na concentração da atividade de MPO.

Já a atividade de EPO é reconhecidamente uma medida indireta do influxo de eosinófilos para o tecido inflamado. Ferreira *et al.* (2012), estudando mucosite oral induzida
30 por 5-FU demonstraram um aumento da atividade de EPO no tecido de animais com mucosite. Tais resultados assemelham-se com os nossos achados. Os animais IG controle ou com mucosite induzida apresentaram níveis de neutrófilos e eosinófilos muito baixos. Nossos dados estão de acordo com dados da literatura que revelam que os animais

IGapresentam tecido linfoide associado à mucosa e linfócitos intraepiteliais reduzidos (GUARNER, 2012).

Já a atividade de NAG é reconhecidamente uma medida indireta do influxo de macrófagos para o tecido inflamado. Ferreira *et al.* (2012) não encontraram infiltrado de macrófagos por meio da dosagem de sua enzima característica em modelo murino de mucosite induzida por 5-FU. Nosso resultado encontrou o mesmo perfil para nosso modelo.

Recentemente, também foi sugerido que outras superfícies mucosas em todo o corpo, tal como o genitourinário e mucosas das vias aéreas, também poderiam ser afetadas pela quimioterapia ou radioterapia (LOGAN *et al.*, 2008). Dessa forma, a fim de verificar se no nosso modelo outros órgãos também teriam infiltrado inflamatório, realizamos análises das enzimas específicas dos tipos celulares.

Com relação ao cólon, verificou-se a presença de infiltrado constituído por neutrófilos no grupo dos animais CV com mucosite induzida. Esse resultado está de acordo com dados da literatura que revelam que apesar do local primário da manifestação de mucosite induzida por CPT-11 ser o jejuno, o cólon também apresenta lesões, onde pode ocorrer hipoplasia das criptas (KEEFE *et al.*, 2007). Stringer (2008) também relatou alterações no cólon causadas por 5-FU e CPT-11. O pesquisador encontrou alterações importantes no cólon, como o aumento da taxa apoptótica de enterócitos. O mesmo autor também encontrou alteração da microbiota intestinal após a administração de CPT-11 em ratos, que coincide com o desenvolvimento de diarreia nesses animais.

Com relação ao pulmão, verificou-se a presença de infiltrado constituído por neutrófilos no grupo dos animais convencionais com mucosite induzida. Este é o primeiro trabalho que avalia a constituição de infiltrado inflamatório no pulmão em modelo murino de mucosite induzida.

A mucosite, segundo fisiopatologia proposta por Sonis (2004), também é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF. Dessa forma, foi realizado experimento a fim de dosá-las. Nosso resultado indica que o grupo dos animais CV com mucosite induzida apresenta maior concentração dessas citocinas no jejuno, quando comparado ao grupo dos animais IG com mucosite induzida. Nosso resultado está de acordo com trabalho realizado por Melo *et al.* (2007), que também relataram aumento dessas citocinas nos animais com mucosite induzida por CPT-11.

Em trabalho realizado por Lima *et al.* (2005), o papel do TNF foi observado no desenvolvimento de mucosite oral: a administração de talidomida e pentoxifilina, ambos inibidores da síntese de TNF, reduziu significativamente as lesões intestinais causadas por 5-FU em hamster. Dessa forma, essa citocina constitui um importante alvo para possíveis terapias para tratamento da mucosite.

Já o papel de IL-1 β é controverso: estudos revelam um aumento na concentração de IL-1 β em modelos de mucosite induzida por radiação ou CPT-11, mas também revelam papel importante durante a fase de cicatrização. Sendo assim, tais observações indicam uma complexa participação de IL-1 β na fisiopatologia da mucosite (FILHO, 2010).

Com relação à dosagem do metabólito ativo do CPT-11, o SN-38, nosso resultado revelou uma maior concentração no fluido intestinal dos animais IG quando comparado aos animais CV, ambos com mucosite induzida. Sabe-se que o metabólito SN-38 possui ação ao interagir com a enzima topoisomerase I, que alivia a tensão contorcional presente no DNA e, portanto, precisa penetrar no interior das células para desempenhar sua função inibitória e desencadear em apoptose celular (JÚNIOR, 2008).

Dessa forma nosso resultado revela que o SN-38 está mais presente no ambiente extracelular do que intracelular dos animais IG, quando comparados aos animais CV, ambos com mucosite induzida. Tal resultado pode justificar, em partes, a piora no quadro dos animais CV com mucosite induzida, já que neste grupo o metabólito estaria interagindo com seu receptor e causando os danos característicos da mucosite. No entanto, outra hipótese seria possível para se explicar esse resultado: segundo Guarner (2012), o trânsito intestinal dos animais IG é mais reduzido do que nos animais CV, e dessa forma o metabólito pode ter se acumulado mais no fluido intestinal dos animais IG do que no dos animais CV. Assim, mais estudos devem ser realizados a fim de se determinar o caminho pelo qual o SN-38 percorre nesses animais.

A partir das análises dos resultados obtidos para os animais CV e IG – os animais CV são mais acometidos pela mucosite do que os animais IG – houve a necessidade de se compreender se as diferenças observadas eram devido à presença da microbiota intestinal (e consequente metabolismo do CPT-11) ou ao desenvolvimento do sistema imunológico, que é reduzido no grupo IG.

Desse modo, foram inseridos mais quatro grupos de trabalho: animais CVO controle/experimental e animais IG com indução de inflamação sistêmica por LPS controle/experimental. Nossos resultados revelaram que a reposição da microbiota

intestinal alterou o perfil hiporresponsivo dos animais IG, fazendo com que o fenótipo destrutivo fosse observado no grupo de animais CVO com mucosite induzida. Em trabalho realizado por Fagundes *et al.* (2012), a reposição da microbiota também foi capaz de alterar o fenótipo hiporresponsivo do animal IG perante infecção por *K. pneumoniae*. Essa
5 alteração fenotípica foi capaz de proteger o animal do agente invasor. No entanto, quando analisamos os dados obtidos de animais IG com inflamação sistêmica induzida por LPS, não há dano histopatológico e presença de infiltrado inflamatório, como visualizado nos animais CV e CVO com mucosite induzida. Além disso, a quantificação de SN-38 no
10 fluido intestinal manteve-se alto, apresentando perfil intermediário entre os grupos de animais com microbiota os IG com mucosite induzida. Souza *et al.* (2004) e Fagundes *et al.* (2012), também não verificaram alteração de fenótipo dos animais IG após ativação do sistema imune via injeção de LPS sistêmico. Tais dados revelam a importância da microbiota intestinal no desenvolvimento e gravidade de mucosite induzida por CPT-11, uma vez que o LPS não foi capaz de reverter o fenótipo observado nos animais IG com
15 mucosite induzida, mas a reposição da microbiota intestinal, sim.

Nesse contexto, quatro novos grupos foram inseridos a fim de se verificar o papel da enzima β -glucuronidase no desenvolvimento de mucosite: animais IG monoassociados com *E. coli* produtora de β -glucuronidase controle/experimental e animais IG monoassociados com *E. coli* não produtora da enzima controle/experimental. Algumas
20 análises foram repetidas, como permeabilidade intestinal, infiltrado inflamatório de neutrófilos como marcador de processo inflamatório e quantificação de SN-38 no fluido intestinal.

Quanto à permeabilidade intestinal, os animais IG monoassociados com *E. coli* produtora de β -glucuronidase e com mucosite induzida apresentaram uma permeabilidade
25 maior do que aquela observada para o grupo de animais IG monoassociados com *E. coli* não produtora da enzima. Tal dado é o primeiro na literatura que revela a efetiva participação da enzima na gravidade da mucosite nos animais.

Quanto ao infiltrado inflamatório e a quantificação de SN-38 no fluido intestinal dos animais, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. No entanto,
30 ao se observar o gráfico, podemos verificar uma tendência de maior infiltrado de neutrófilos no tecido de animais monoassociados com *E. coli* produtora de β -glucuronidase, quando comparado ao grupo de animais monoassociados com *aE. coli* não produtora dessa enzima. Quando se observa o gráfico de determinação da concentração de

SN-38 no ambiente extracelular, também pode-se perceber uma tendência de maior achado de SN-38 no fluido do grupo de animais monoassociados com *E. coli* não produtora de β -glucuronidase, quando comparado ao grupo de animais monoassociados com *E. coli* produtora da enzima. Segundo Filho *et al.* (2010), a meia vida do SN-38 é curta em humanos e, dessa forma, um experimento envolvendo cinética e aumentando o “n” amostral poderiam auxiliarnuma melhor compreensão acerca da ação do metabólito ativo e atividade da ezima bacteriana no ambiente intestinal.

Assim, de maneira sucinta, nossos dados revelam que a microbiota intestinal desempenha um papel fundamental na mucosite induzida por CPT-11 em modelo animal e que a enzima β -glucuronidase bacteriana estaria relacionada ao aumento da permeabilidade intestinal nos animais.

Sendo assim, nosso estudo serve como base para o melhor entendimento da fisiopatologia da mucosite induzida por CPT-11 e, portanto, um importante passo para o possível desenvolvimento de uma terapia mais eficaz.

7.0.CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que a microbiota intestinal possui papel relevante para o desenvolvimento de mucosite induzida por CPT-11 em modelo murino, e que a enzima β -glucuronidase bacteriana estaria envolvida no aumento da permeabilidade intestinal no modelo utilizado.

8.0.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M.; MIDTVEDT, T.; URIBE, A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germ-free rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 29, p. 445-451, 1994.
- 5 ALIMONTI, A., *et al.* Prevention of irinotecan plus 5-FU/leucovorin-induced diarrhoea by oral administration of neomycin plus bacitracin in first line treatment of advanced colorectal cancer. **Annals of Oncology**, v. 14, p. 805-806, 2003.
- 10 AMARAL, F. A. *et al.* Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 2193-2197, 2008.
- ANDREMONT, A., *et al.* The use of germ-free mice associated with human fecal flora as
 15 an animal model to study enteric bacterial interactions. **Bacterial Diarrhea Disease**, v. 22, p. 219-228, 1985.
- ARANTES, R. M. E.; NOGUEIRA, A. M. M. F. Distribution of enteroglucagon and peptide YY immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional
 20 mice. **Cell and Tissue Research**, v. 290, p. 61-69, 1997.
- BACKHED, F., *et al.* Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 307, p. 1915-1920, 2005.
- 25 BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods in Enzymology**, v. 162, p. 327-334, 1988.
- BAILEY, M. T., DOWD, S. E., GALLEY, J. D. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: Implications for stressor-induced
 30 immunomodulation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, p. 397-407, 2011.
- BANSAL, T., *et al.* Development and validation of reversed phase liquid chromatographic method utilizing ultraviolet detection for quantification of irinotecan (CPT-11) and its

active metabolite, SN-38, in rat plasma and bile samples: Application to pharmacokinetic studies. **Talanta**, v. 76, p. 1015-1021, 2008.

5 BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **The Lancet**, v. 369, p. 1627-1640, 2007.

BEAUD, D., TAILLIEZ, P., ANBA-MONDOLONI, J. Genetic characterization of the b-glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium, *Ruminococcus gnavus*. **Microbiology**, v. 151, p. 2323-2330, 2005.

10

BOOIJINK, C.C., *et al.* High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 3213-3227, 2010.

15 BOWEN, J. M., *et al.* Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 59, p. 337-348, 2007.

BRANDI, G., *et al.* Intestinal microflora and digestive toxicity of irinotecan in mice. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 1299-1307, 2006.

20 BROWN, L. R., *et al.* The effect of radiation-induced xerostomia on saliva and serum lysozyme and immunoglobulin levels. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 41, p. 83-92, 1976.

25 CALVERT, R.J., OTSUKA, M., SATCHITHANANDAM, S. Consumption of raw potato starch alters intestinal function and colonic cell proliferation in the rat. **The Journal of Nutrition**, v. 119, p. 1610-1616, 1989.

30 CARNEIRO-FILHO, B. A., *et al.* Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 49, p. 65-72, 2004.

CETEA. **Comitê de Ética em Experimentação Animal - UFMG (2011). Protocolos anestésicos comumente utilizados em animais de pequeno porte.**

CHOI, K., et al. The effect of oral glutamine on 5 fluorouracil/leucovorin-induced mucositis/stomatitis assessed by intestinal permeability test. **Clinical Nutrition**, v. 26, p. 57-62, 2007.

5

COBEA. Colegio Brasileiro de Experimentação Animal (2006) Legislação e Ética. <http://www.cobea.org.br/>. Acessado em 30/07/2012.

CRYAN, J. F., DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, p. 701-712, 2012.

10

DAVE, M., et al. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. **Translational Research**, p. 1-12, 2012.

DEKANEY, C. M., et al. Regeneration of intestinal stem/progenitor cells following doxorubicin treatment of mice. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 297, p. 461-470, 2012.

15

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. **Nature**, v. 449, p. 811-818, 2007.

20

DOMINGUEZ-BELLO, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 11971-11975, 2010.

25

DUCLUZEAU, R. Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In **BERGOGNE-BEREZIN, E. (eds.). Microbial Ecology and Intestinal Infections**. Paris: Springer-Verlag, p. 7-29, 1989.

30

ECKBURG, P. B., et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, p. 1635-1638, 2005.

ELPHICK, D.A. & MAHIDA, Y.R. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. **Gut**, v. 54, p. 1802-1809, 2005.

5 ELTING, L. S., *et al.* The burdens of cancer therapy, clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, v. 98, p. 1531-1539, 2003.

ELTING, L. S., *et al.* Risk, outcomes and costs of radiationinduced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Internacional Journal of Radiation Oncology**, v. 68, p. 1110-1120, 2007.

10

FAGUNDES, C. T., *et al.* Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 1411-1420, 2012.

15 FALK, P. G., *et al.* Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 1157-1170, 1998.

20 FARTHING, M. J. G. Bugs and the gut: an unstable marriage. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 233-239, 2004.

FEDORAK, R. N. Naturally occurring and experimental models of inflammatory bowel disease, p. 71-95, 1995. *In* KIRSTNER, J. B.; SHORTER, R. G. (ed.). **InflammatoryBowel Disease**, 4th. ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA.

25

FERREIRA, T. M., *et al.* Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids**, v. 47, p.669-678, 2012.

30

FILHO, J. N. B. **Modulação da Resposta Inflamatória com Dexametasona Reverte a Dismotilidade Gastrintestinal Associada à Mucosite Intestinal Induzida por**

Irinotecano em Camundongos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 2010.

5 GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, p. 503-14, 2010.

10 GENEROSO S. V., *et al.* Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. **European Journal of Nutrition**, v. 50, p. 261-269, 2011.

15 GIBSON, R. J., *et al.* Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats. **Digestive Diseases and Science**, v. 47, p.2751-2777, 2002.

GIBSON, R. J., *et al.* Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, p. 1095-1100, 2003.

20 GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Supportive Care in Cancer**, v. 14, p. 890-900, 2006.

25 GILL, H. S.; GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgraduated Medical Journal**, v 80, p. 516-526, 2004.

GORBACH, S. L.; GOLDIN, B. R. The intestinal microflora and the colon cancer connection. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, p. S252-S261, 1990.

30 GORDON, H. A.; PESTI, L. The gnotobiotic animal as tool in the study of host microbial relationships. **Bacteriological Reviews**, v. 35, p. 390-429, 1971.

GUARNER, F. **The Enteric Microbiota**. Colloquium Series On Integrated Systems Physiology: from Molecule To Function To Disease. Universidade de Missisipi, 2012.

- 5 GUSTAFSSON, B. E. Germ-free rearing of rats, general techniques. **Acta Pathologica et Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 111 (supl. LXX), 1948.

GUSTAFSSON, B. E.; MIDTVEDT, T.; STRANDBERG, K. Effects of microbial contamination on the cecum enlargement of germ-free rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 5, p. 309-314, 1970.

10

GUSTAFSSON, B. E. The germ-free: its potential and its problems. In COATES, M. E. & GUSTAFSSON, B. E. (eds.). **The Germ-free Animal in Biomedical Research**. London: Laboratory Animals Ltd., p. 1-10, 1984.

- 15 HALLETT, J. M., *et al.* Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, p. 250-257, 2008.

- 20 HAYASHI, H., *et al.* Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1093-1101, 2005.

- 25 HEYMAN, M., *et al.* Intestinal absorption of macromolecules during viral enteritis: an experimental study on rotavirus-infected conventional and germ-free mice. **Pediatric Research**, v. 22, p. 72-78, 1987.

HOLMES, E., *et al.* Understanding the role of gut microbiome-host metabolic signal disruption in health and disease. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 349-359, 2011.

- 30 ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 299-313, 2004.

JUNIOR, R. C. P. L. **Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

- 5 JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KEEFE, D. M., *et al.* Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, v. 47, p. 632-637, 2000.

10

KEEFE, D. M.; GIBSON, R. J. Mucosal injury from targeted anticancer therapy. **Supportive Care in Cancer**, v. 15, p. 483-490, 2007.

- 15 KEHRER, D. F., *et al.* Factors involved in prolongation of the terminal disposition phase of SN-38: clinical and experimental studies. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3451-3458, 2000.

KEHRER, D. F., *et al.* Modulation of irinotecan-induced diarrhoea by cotreatment with neomycin in cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 1136-1141, 2001.

20

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. **Cell**, v. 124, p. 837-848, 2006.

- 25 LIMA, V., BRITO, G. A. C., CUNHA, F. Q. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **European Journal of Oral Sciences**, v. 113, p. 210-217, 2005.

- 30 LOGAN, R. M., *et al.* Characterization of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 62, p. 33-41, 2008.

MACKIE, R. I.; SGHIR, A.; GASKINS, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 1035S-1045S, 1999.

- 5 MALOY, K.J. & POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, p. 298-306, 2011.

MARTINS, F.S., *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 352-357, 10 2007.

MARTINS, F.S., *et al.* Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the 15 activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 359-364, 2011.

MATTHIAS, E. *et al.* Invasion and destruction of mucosal plasma cells by *Tropheryma whippelii*. **Human Pathology**, v. 28, p. 1424-1428, 1997.

20

MCMANUS, J. F. A., MOWRY, R. W. **Staining Methods, Histologic and Histochemical**. Nova Iorque: Hober, 1960.

MELICHAR, B., *et al.* Intestinal permeability in patients with chemotherapy-induced 25 stomatitis. **Cancer Research on Clinical Oncology**, v. 127, p. 314-318, 2001.

MELO, M. L. P., *et al.* Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 61, p. 775-784, 2007.

30

MORRONE, F.B., LENZ, G. **Estudo da proliferação e Síntese de DNA Induzidos Por Nucleotídeos e Nucleosídeos em Linhagens Celulares de Gliomas**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Rio Grande do Sul, 2002.

NICOLI, J. R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 15, p. 183-190, 1995.

- 5 NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: LP Castro; LGV Coelho. (Org.). **Gastroenterologia**, 1 ed. Rio de Janeiro, v. 1, p. 1037-1047, 2004.

- 10 OHWAKI, M., *et al.* A comparative study on the humoral immune responses in germ-free and conventional mice. **Immunology**, v. 32, p 43-48, 1977.

- 15 OLIVEIRA, F. M. S., *et al.* Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. **Infectious Disease Reports**, v. 4, p. 106-113, 2012.

- PABST, O. New concepts in the generation and functions of IgA. **Nature reviews Immunology**, v. 12, p. 821-832 2012.

- 20 PARIS, F., *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. **Science**, v. 293, p. 293-297, 2001.

- 25 PENDERS, J., *et al.* Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, p. 601-607, 2013.

- PICO, J. L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. **The Oncologist**, v. 3, p. 446-451, 1998.

- 30 PLEASANTS, J. R. Gnotobiotics. In: Melby Jr E. C., Altmann N. H. **Handbook of Laboratory Animal Science**. Cleveland. CRC press, p. 119-174, 1974.

RIDAURA, V. K., *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. **Science**, v. 341, n. 6150, 2013.

5 ROGLER, G. Prebiotics and probiotics in ulcerative colitis: Where do we stand? **Digestion**, v. 84, p. 126-127, 2011.

ROSSI, A. G., *et al.* Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 288-291, 2007.

10 ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 313-323, 2009.

15 RUBENSTEIN, E. B., *et al.* Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100, p. 2026-2046, 2004.

SALTZ, L. B., *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 905-914, 2000.

20 SANTOS, L. M. *et al.* Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii*UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 200, p. 29-38, 2011.

25 SARTOR, R. B. Microbial factors in Crohn's disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation, p. 96-124, 1995. In KIRSTNER, J. B.; SHORTER, R. G. (ed.). **Inflammatory Bowel Disease**, 4th. ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA.

30 SARTOR, R. B. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature**, v. 3, p. 390-407, 2006.

SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p.107-133, 1977.

SAVARESE, D. M.; HSIEH, C.; STEWART, F. M. Clinical impact of chemotherapy dose escalation in patients with hematologic malignancies and solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v.15, p. 2981-2985, 1997.

SCHROEDER, H. W., CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 41-52, 2010.

SEKIROV, I., *et al.* Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, p. 859-904, 2010.

SELLON, R. K., *et al.* Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 5224-5231, 1998.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 405-440, 2004.

SHINOARA, H., *et al.* Prevention of intestinal toxic effects and intensification of irinotecan's therapeutic efficacy against murine colon cancer liver metastases by oral administration of the lipopeptide JBT 3002. **Clinical Cancer Research**, v. 4, p. 2053-2063, 1998.

SILVA, M. E. **Modelos experimentais para o estudo de doença de Chagas, camundongos e ratos isentos de germes e convencionais**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Belo Horizonte, 1986.

SOMMER, F; BACKHED, F. The gut microbiota – masters of host development and physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 227-238, 2013.

SONIS, S. T. *et al.* Transforming growth factor- β 3 mediated modulation of cell cycling and attenuation of 5-fluorouracil induced oral mucositis. **Oral Oncology**, v. 33, p. 47-54, 1997.

5 SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, p. 277-284, 2004.

SOUZA, D. G., *et al.* Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 1800-1808, 2000.

10

SOUZA, D. G., *et al.* The essential role of intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 4137-4146, 2004.

15 STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, v. 83, p. 209-215, 1985.

20 STRINGER, A. M., *et al.* Chemotherapy induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA Rat. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 96-107, 2007.

25 STRINGER, A. M. **Chemoterapy-induced mucositis: The role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal enviroment**. Tese (Doutorado). - The University of Adelaide, Adelaide, 2008.

STRINGER, A. M., *et al.* Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Internacional Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 489-499, 2009.

30 STRINGER, A. M. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. **Nutrients**, v. 5, p. 1488-1499, 2013.

SWIDSINSKI, A., LOENING-BAUCKE, V. **Functional Structure of Intestinal Microbiota in health and disease**, 2002. Disponível em <<http://www.charite.de/arbmkl/themen/ubersicht/intestinalmicrobiota.pdf>> Acesso dia 09 de janeiro de 2014.

5

TAKASUNA, K., *et al.* Inhibition of intestinal microflora β -glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 2, p. 280-286, 1998.

10

TRYLAND, I.; FIKSDAL, L. Enzyme characteristics of beta-D- galactosidase- and beta-D-glucuronidase-positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 1018-1023, 1998.

15

VANHOEFER, U., *et al.* Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, p. 1501-1518, 2001.

VLIET, M. J., *et al.* The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **Plos Pathogens**, v. 6, nº 5, p. 1-7, 2010.

20

WADKINS, R. M., *et al.* Discovery of novel selective inhibitors of human intestinal carboxylesterase for the amelioration of irinotecan-induced diarrhoea: synthesis, quantitative structure-activity relationship analysis, and biological activity. **Molecular Pharmacology**, v. 65, p. 1336-1343, 2004.

25

WALTER, J.; LEY, R. The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 65, p. 411-429, 2011.

WIRTZ, S., *et al.* Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols**, v. 2, p. 541-546, 2007.

30

WOSTMANN, B. S. **Germ free and gnotobiotic animal models: background and applications**. Boca Raton, Flórida: CRC PRESS, 1996.

YEOH, A. S. J., *et al.* A novel animal model to investigate fractionated radiotherapy-induced alimentary mucositis: the role of apoptosis, p53, nuclear factor-kB, COX-1, and COX-2. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, p. 2319-2327, 2007.


5

YOUNG, B., *et al.* **Wheater's functional histology: a text and colour atlas**. 5^a ed. Elsevier, 2006.

9.0. ANEXO

CERTIFICADO EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UFMG

5

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