

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALEKSANDER BRANDÃO SANTANA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO MURINO FRENTE À INFECÇÃO
PELA BACTÉRIA OPORTUNISTA *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO DE
MUCOSITE INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU).**

Alfenas/MG

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ALEKSANDER BRANDÃO SANTANA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO MURINO FRENTE À INFECÇÃO
PELA BACTÉRIA OPORTUNISTA *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO DE
MUCOSITE INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU).**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL-MG.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Santana, Aleksander Brandão

S232a Avaliação da resposta do hospedeiro murino frente à infecção pela bactéria oportunista *Pseudomonas aeruginosa* em modelo de mucosite induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) / Aleksander Brandão Santana. -- Alfenas/MG, 2020.
60 f.: il. --

Orientadora: Leonardo Augusto de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Mucosite. 2. Parasitologia. 3. *Pseudomonas aeruginosa*. 4. Fluorouracil.
5. Disbiose. I. Almeida, Leonardo Augusto de. II. Título.

CDD- 571.97

Ficha Catalográfica elaborada por Marlom Cesar da Silva
Bibliotecário-Documentalista CRB6/2735



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas, MG.
CEP: 37130-001



ALEKSANDER BRANDÃO SANTANA

**“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO MURINO FRENTE À INFECÇÃO
PELA BACTÉRIA OPORTUNISTA *Pseudomonas aeruginosa* EM MODELO DE
MUCOSITE INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO 5-FLUOROURACIL (5-FU)”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Biologia Celular, Molecular e
Estrutural das doenças agudas e crônicas

Aprovado em: 27 de janeiro de 2020.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Leonardo Almeida

Prof. Dr. Daniel Bonoto Gonçalves
Instituição: UFSJ/CCO

Assinatura: Daniel Bonoto Gonçalves

Profa. Dra. Tatiana de Teixeira Miranda
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Tatiana de Teixeira Miranda

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

O tratamento de tumores malignos envolve a utilização de quimioterapia na tentativa de controlar ou combater o crescimento desordenado das células. Entretanto, diversos efeitos adversos ocorrem durante esse tratamento, sendo um exemplo, a inflamação grave das mucosas do trato gastrointestinal, conhecida como mucosite gastrointestinal, assim como infecções oportunistas com complicações potencialmente fatais. Este trabalho objetivou avaliar a resposta do hospedeiro frente à infecção pela bactéria oportunista *Pseudomonas aeruginosa* em modelo de mucosite induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil(5-Fu). Para isso, quatro grupos experimentais constituídos de camundongos Balb/c foram utilizados: G1 – PBS/Não infectado(tampão salino-fosfato); G2 – PBS/Infectado; G3 - 5- Fu /Não infectado; G4 - 5-Fu/Infectado. Os animais receberam uma dose intraperitoneal de solução salina estéril ou de 5-Fu por 3 dias consecutivos para indução da mucosite. A administração do quimioterápico 5-Fu acarretou na perda de peso dos animais no decorrer de três dias consecutivos do tratamento, e fezes moderadamente úmidas a partir do terceiro dia quando comparados aos animais que não foram tratados com o 5-Fu. O DNA fecal dos animais foi extraído para análise dos grupos filogenéticos bacterianos. A composição da microbiota fecal dos animais sob condições de mucosite se apresentou alterada. Os animais dos grupos PBS/Infectado e 5-Fu/Infectado foram infectados intratraquealmente pela estirpe virulenta PA14 de *P. aeruginosa*. Dez horas após a infecção, foi observada uma maior recuperação de bactérias viáveis no pulmão, fígado e baço nos animais em condições de mucosite. As análises histopatológicas e estereológicas mostraram que os animais tratados com 5-Fu apresentaram lesões estruturais no ceco. No pulmão do grupo 5-Fu/não Infectado, os animais apresentaram discreto espessamento septal porém nos grupos PBS/infectado e 5-Fu/infectado houve intenso infiltrado inflamatório e espessamento de septos alveolares. O fígado de animais infectados apresentou intenso infiltrado inflamatório com degeneração hidrópica em hepatócitos. No grupo 5-Fu/não infectado, essas alterações se apresentaram de maneira discreta. O RNA total do pulmão e baço foi extraído para análise da expressão diferencial de *TNF- α* (Fator de necrose tumoral alpha) e *iNOS*(Óxido nítrico sintetase). Uma maior expressão dos genes *TNF- α* e de *iNOS* foi observada no baço dos animais infectados sob condições de mucosite. A expressão de *iNOS* se mostrou aumentada nos pulmões do grupo 5- Fu/Infectado. Os resultados sugerem que a administração do quimioterápico 5-Fu em modelo murino o torna mais suscetível à infecção pulmonar pela bactéria oportunista *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Mucosite. *Pseudomonas aeruginosa*. 5-Fluorouracil. Disbiose.

ABSTRACT

Treatment of malignant tumors involves the use of chemotherapy in an attempt to control or combat disordered cell growth. However, several adverse effects occur during this treatment, such as severe inflammation of the mucosa of the gastrointestinal tract, known as gastrointestinal mucositis, as well as opportunistic infections with life-threatening complications. This study aimed to evaluate the host response to infection by opportunistic bacteria *Pseudomonas aeruginosa* in a model of mucositis induced by 5-Fluorouracil(5-Fu) chemotherapy. For this, four experimental groups consisting of Balb/c mice were used: G1 - PBS/Uninfected(saline-phosphate buffer); G2 - PBS/Infected; G3 - 5-Fu/Uninfected; G4 - 5-Fu/Infected. Animals received an intraperitoneal dose of sterile saline or 5-Fu for 3 consecutive days for mucositis induction. The administration of 5-Fu chemotherapy resulted in the animals losing weight during three consecutive days of treatment, and moderately moist feces from the third day when compared to animals that were not treated with 5-Fu. Animal fecal DNA was extracted for analysis of bacterial phylogenetic groups. Faecal microbiota composition of animals under mucositis conditions was altered. Animals from the PBS/Infected and 5-Fu/Infected groups were infected intratracheally by the *P. aeruginosa* virulent strain PA14. Ten hours after infection, a greater recovery of viable bacteria in the lung, liver and spleen was observed in animals under mucositis conditions. Histopathological and stereological analysis showed that animals treated with 5-Fu presented structural lesions in the caecum. In the lung of the 5-Fu/non-infected group, the animals presented slight septal thickening but in the PBS/Infected and 5-Fu/Infected groups there was intense inflammatory infiltrate and alveolar septa thickening. The liver of infected animals showed intense inflammatory infiltrate with hydropic degeneration in hepatocytes. In the 5-Fu / uninfected group, these changes appear discreetly. Total lung and spleen RNA were extracted for analysis of differential expression of *TNF- α* (Tumor necrosis factor alpha) and *iNOS*(Nitric oxide synthase). Higher expression of *TNF- α* and *iNOS* genes was observed in the spleen of infected animals under mucositis conditions. *iNOS* expression was increased in the lungs of the 5-Fu/Infected group. The results suggest that administration of 5-Fu chemotherapy in a murine model makes it more susceptible to lung infection by opportunistic bacteria *P. aeruginosa*.

Keywords: Mucositis. *Pseudomonas aeruginosa*. 5-Fluorouracil. Dysbiosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Animais Balb/c sob condições de tratamento com o quimioterápico 5-Fu apresentam expressiva perda de peso quando comparados a animais não tratados (NT).....32
- Figura 2 - Animais Balb/c sob condições de tratamento com o quimioterápico 5-Fu apresentam alteração da consistência fecal quando comparados a animais não tratados (NT).....33
- Figura 3 - Animais tratados com 5-Fu apresentam maior quantidade de bactérias totais no conteúdo fecal com aumento expressivo de *Proteobacterias* e diminuição de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.....34
- Figura 4 - Análise histopatológica do ceco de camundongos PBS/Não infectados e 5-Fu/Não infectados.....35
- Figura 5 - Animais MIQ apresentam menor espessura da mucosa e maior quantidade de linfócitos intraepiteliais quando comparados a animais não tratados..36
- Figura 6 - Animais sob condições de mucosite induzida pelo 5-Fu são mais suscetíveis à infecção pulmonar pela *P. Aeruginosa*.....38
- Figura 7 - Análise histopatológica do pulmão de camundongos PBS/não infectados, PBS/infectados, 5-Fu/não infectados, 5-Fu/infectados analisados 10 horas após a infecção com a estirpe PA14 de *P. Aeruginosa*.....40
- Figura 8 - Animais MIQ apresentam espaço alveolar reduzido e septo mais largo quando comparados a animais não tratados (NT).....41
- Figura 9 - Análise histopatológica do fígado de camundongos PBS/Não infectados, PBS/Infectados, 5-Fu/Não infectados, 5-Fu/Infectados analisados 10 horas após a infecção com a estirpe PA14 da *P. Aeruginosa*.....43
- Figura 10 - Animais MIQ apresentam menor densidade de capilares sinusóides hepáticos, maior celularidade intersticial, degeneração hidrópica e núcleo de hepatócitos quando comparados a animais não tratados.....44
- Figura 11 - Animais sob condições de mucosite induzida pelo 5-Fu e infectados pela *P. aeruginosa* apresentam maior expressão diferencial dos genes *iNOS* no baço e pulmão quando comparados aos animais controles.....45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados nas análises de PCR em tempo real...	28
Tabela 2 - Sequência dos primers dos filos bacterianos para análises de PCR em tempo real.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ARRIVE	-Pesquisa em Animais: Relato de Experiências In Vivo
CTFR	-Regulador de condutância transmembranar de fibrose cística
CXCL	-Ligante de quimiocina
DAMPs	-Padrões Moleculares Associados a Danos
DNA	-Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	-Desoxinucleosídeos trifosfato
DO	-Densidade ótica
DPD	-Dihidropirimidina-desidrogenase
dUMP	-Deoxiurimidina monofosfato
dTMP	-Desoxitimidina monofosfato
FC	-Fibrose cística
FDA	-Agência de administração de alimentos e medicamentos
IL	-Interleucina
<i>iNOS</i>	-Óxido nítrico sintetase
LB	-Luria Bertani
LPS	-Lipopolissacarídeo
MIQ	-Mucosite induzida por quimioterápico
NF- κ B	-Fator nuclear kappa B
NO	-Óxido Nítrico
PBS	-Tampão salino-fosfato
PCR	-Reação em cadeia da polimerase
PEPT1	-Transportador de peptídeos 1
P-gp	-Glicoproteína-P
PRRs	-Receptores de reconhecimento de padrões
RNA	-Ácido ribonucleico
T3SS	-Sistema de Secreção de Tipo III
T CD4	-Linfócito T auxiliar
T CD8	-Linfócito T citotóxico
TGI	-Trato gastrointestinal
TLR	-Receptor semelhante à <i>Toll</i>
TMF	-Transplante de microbiota fecal
<i>TNF-α</i>	-Fator de necrose tumoral alpha

UFC	-Unidade formadora de colônia
UTI	-Unidade de tratamento intensivo
5- Fu	-5- Fluorouracil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Modelo de Mucosite e a Microbiota intestinal	14
2.2	Mucosite gastrintestinal associadaa quimioterapia	16
2.3	O quimioterápico 5– Fluorouracil	17
2.4	Quimioterapia e infecções oportunistas.....	18
2.5	<i>P. aeruginosa</i> e infecções oportunistas	20
3	JUSTIFICATIVA	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	Objetivo Geral.....	24
4.2	Objetivos Específicos.....	24
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5.1	Animais e indução da mucosite	25
5.2	Curva de proliferação de <i>P. Aeruginosa</i>	25
5.3	Cultivo das estirpes de <i>P. Aeruginosa</i>	26
5.4	Infecção pela bactéria <i>P. Aeruginosa</i>	26
5.5	Contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs).....	27
5.6	Extração de RNA total.....	27
5.7	Síntese de cDNA a partir de reação mediada por transcriptase reversa.....	27
5.8	Análise da expressão diferencial de genes por PCR em tempo real.....	28
5.9	Extração de DNA fecal.....	28
5.10	Processamento histológico e processamento de imagens microscópicas.....	29
5.11	Análise histopatológica.....	29
5.12	Análise histomorfométrica.....	30
5.13	Análises Estatísticas.....	30
6	RESULTADOS.....	32
6.1	Camundongos sob tratamento com 5-Fu apresentaram mucosite com intensa perda de peso e alteração da consistência fecal.....	32
6.2	Animais MIQ apresentam maior quantidade de bactérias totais no conteúdo fecal com aumento expressivo de <i>Proteobacterias</i> e diminuição de <i>Bacteroidetes</i> e <i>Firmicutes</i>	34
6.3	Animais MIQ apresentam alterações histológicas na mucosa intestinal com aumento da concentração de células inflamatórias e desarranjo na arquitetura cecal.....	35
6.4	Animais MIQ são mais suscetíveis à disseminação da <i>P. aeruginosa</i> no pulmão, fígado e baço em comparação aos infectados.....	37

6.5	Animais MIQ apresentam maiores danos teciduais durante a infecção pulmonar por <i>P. aeruginosa</i>	39
6.6	Animais sob condições de mucosite induzida pelo 5-Fu apresentam maior expressão de <i>iNOS</i> e <i>TNF-α</i> quando infectados pela <i>P. aeruginosa</i> nos órgãos colonizados pela bactéria.....	45
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS.....	59

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas são um grupo de doenças caracterizadas por alterações genéticas e descontrole mitótico. O tratamento dos tumores com características malignas envolve a utilização de quimioterapia e radioterapia na tentativa de controlar ou combater seu crescimento desordenado (PÉREZ DE CASTRO; DE CÁRCER; MALUMBRES, 2007). Apesar da intenção da terapia, diversos efeitos adversos ocorrem durante o tratamento, principalmente por sua toxicidade às células saudáveis. A mucosite, inflamação grave das mucosas do trato gastrointestinal, ocorre frequentemente nos pacientes sob tratamento quimioterápico (DO CARMO *et al.*, 2018; LO *et al.*, 2012), assim como infecções oportunistas com complicações potencialmente fatais (AOUN, 2004).

O 5-Fluorouracil (5-Fu) é um quimioterápico comumente usado na prática clínica. Algumas complicações acontecem durante o seu uso, como toxicidade à medula óssea, dermatites e diarreia (DO CARMO *et al.*, 2018; LO *et al.*, 2012). O resultado da inflamação causada pela medicação antineoplásica é descrita por Do Carmo e colaboradores (2018) como degeneração de células epiteliais intestinais, influxo de células leucocitárias no intestino delgado, mais especificamente na lâmina própria, dano aos vasos presentes na camada submucosa de tecido conjuntivo, definhamento das projeções intestinais (vilosidades), além de apoptose e formação incompleta ou defeituosa (hipoplasia) das criptas intestinais; situações que prejudicam a função absorptiva intestinal e sua função de barreira epitelial (DO CARMO *et al.*, 2018).

Os pacientes em terapia oncológica comumente evoluem para quadros de leucopenia, consequência da imunossupressão quimioterápica. Tal situação, associada ao quadro inflamatório que prejudica a função da barreira epitelial, favorece a translocação de microrganismos do lúmen intestinal para outros tecidos. Pacientes com leucopenia estão mais susceptíveis a bacteremia, e fungemia (RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012).

Cerca de 60~65% das infecções descritas nos pacientes em tratamento de neoplasia maligna estão relacionadas às bactérias Gram-negativas (FABER *et al.*, 2011). Dentre essas bactérias, a *Pseudomonas aeruginosa* é considerada uma das principais causas de infecções pulmonares oportunistas nestes pacientes. A espécie *P. aeruginosa* é uma bactéria extracelular, Gram- negativa, aeróbia, não fermentadora de glicose e não formadora de esporos, pertencente à família *Pseudomonadaceae* (BASSETTI *et al.*, 2018; DUBOIS *et al.*, 2001; GELLATLY; HANCOCK, 2013; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

A morbidade e a mortalidade nas doenças oncológicas são elevadas na presença de infecções oportunistas. Pacientes com mucosite são mais susceptíveis a invasão de microrganismos. Sendo assim, entender a relação entre a mucosite causada por agentes quimioterápicos, a alteração das espécies bacterianas presentes associadas ao trato gastrointestinal e a suscetibilidade a infecções oportunistas é de suma importância no contexto médico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico serão apresentadas as principais informações pertinentes para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 Modelo de Mucosite e a Microbiota intestinal

Mucosite gastrointestinal é a inflamação seguida por ulceração do revestimento mucoso do trato gastrointestinal, ocasionada em pacientes sob tratamento quimioterápico e/ou radioterápico (LO *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ-CABALLERO *et al.*, 2012).

Os primeiros modelos de mucosite induzida foram propostos por Dorr e colaboradores, na década de 90, a partir de radioterapia que induzia a ulcerações na mucosa de camundongos, especificamente na parte inferior da língua (DÖRR; BRANKOVIC; HARTMANN, 2000). O objetivo era avaliar a eficácia do reparo epitelial por meio do prejuízo radioterápico provocado em doses fracionadas. Sonis e colaboradores, no início do ano 1990, observaram a relação de utilização da quimioterapia em hâmsers por injeção intraperitoneal de 5-Fu e aparecimento de lesões ulceradas na mucosa (SONIS *et al.*, 1990). Posteriormente, esses modelos foram modificados por diversos autores. Atualmente, a utilização de modelos animais para entendimento da complexa progressão da mucosite e repassar de maneira translacional a humanos é um desafio enfrentado pela comunidade científica. Entretanto, devido à dificuldade de se obter amostras humanas, com conseqüente problemas éticos e de desconforto a pacientes, empregar o modelo animal se tornou mais viável (SANGILD *et al.*, 2018; VIEIRA; RESUMO, 2018; WARDILL *et al.*, 2019).

A facilidade de manuseio e possibilidade de controle experimental ao utilizar modelos animais para indução da mucosite por quimioterapia/radioterapia permitiram entender a fisiologia e biomarcadores envolvidos na causa dessa enfermidade. A compreensão destes são imprescindíveis para o surgimento de novas terapias e inovações ao se tomar decisões de maneira capacitada e competente na prática clínica (SANGILD *et al.*, 2018; WARDILL *et al.*, 2019).

Protocolos experimentais de mucosite induzida por quimioterápico (MIQ) são realizados principalmente em roedores e leitões. Na mucosite gastrointestinal seu entendimento ocorre a partir da associação entre presença da mucosite oriunda de estímulo quimioterápico ou radioterápico, resposta imunológica do hospedeiro e microbiota comensal (SANGILD *et al.*, 2018; WARDILL *et al.*, 2019).

É possível observar na literatura científica a partir dos estudos de Hong e colaboradores (2019), Li e colaboradores (2017), Stringer e colaboradores (2013), que a modificação do microbioma bacteriano comensal alterando sua homeostase simbiótica está fortemente

assossiado a uma contribuição da susceptibilidade e gravidade sintomatológica da mucosite. Uma microbiota intestinal saudável é composta basicamente por *Bacteroidetes* e *Firmicutes* tanto em modelo murino quanto em seres humanos e suas principais diferenças se devem pelas divergências em hábitos alimentares, colonização durante o parto, higiene, estilo de vida e administração farmacológica. A microbiota humana residente será adquirida primeiramente no nascimento e a partir daí por abundantes microrganismos trazidos pela alimentação via oral. Esse ecossistema microbiano atua de maneira sinérgica e tem papel fundamental na manutenção de nossa saúde seja pela modulação do sistema imune inato e adaptativo, assim como pelas repercussões sistêmicas fora dos pontos de colonização, proteção epitelial, funções metabólicas e absorptivas (HONDA; LITTMAN, 2016; JANDHYALA *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2018).

Uma mucosa intestinal ulcerada associada à disbiose causada por agentes citotóxicos tem maior susceptibilidade à translocação bacteriana de grupos patogênicos para o homem e animais como a classe de *Gammaproteobacterias* que inclui: *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae* e *P. aeruginosa* (MOUGEOT *et al.*, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2010).

A disbiose é associada a diversas enfermidades sendo identificada como fator determinante na relação saúde/doença entre as mais diversas espécies. Um exemplo rotineiro é a quimioterapia/radioterapia e o uso indiscriminado de antibióticos, capazes de exercer pressão seletiva no microbioma e selecionar microrganismos resistentes, problema emergencial de saúde pública mundial (MONTASSIER *et al.*, 2015; PETERSON; KAUR, 2018).

O estudo de Li e colaboradores (2017) demonstrou que recolonizar a microbiota intestinal através do transplante de microbiota fecal (TMF) é capaz de atenuar os danos causados pela toxicidade a partir da utilização de quimioterápico 5-Fu na mucosite gastrointestinal. Reduzir a intensidade dos efeitos colaterais é uma estratégia clínica de suma importância uma vez que tais tratamentos quimioterápicos e radioterápicos geram prejuízos psicobiológicos aos pacientes ocasionando em alta taxa de desistência/baixa adesão pelos pacientes ao tratamento (HAUNER; MAISCH; RETZ, 2017; YOTSUMOTO *et al.*, 2017).

A superfície epitelial intestinal é protegida por um líquido de caráter viscoso denominado muco, este é formado por polímeros em uma complexa rede estrutural de mucinas sendo capaz de imobilizar bactérias, impedindo a passagem de microrganismos ou endotoxinas através da mucosa intestinal (STRINGER *et al.*, 2009). O estudo de Stringer e colaboradores (2009) demonstrou que apenas uma dose do quimioterápico 5-Fu foi capaz de interferir na organização estrutural e anatômica das mucinas.

2.2 Mucosite gastrointestinal associada a quimioterapia

Uma das consequências do tratamento de neoplasias malignas é o desenvolvimento de mucosite (DO CARMO *et al.*, 2018). Esta enfermidade do trato gastrointestinal é consequência dos processos de quimioterapia e radioterapia utilizados no combate e/ou controle do crescimento tumoral (MENEZES-GARCIA *et al.*, 2018).

Do Carmo e colaboradores (2018) expõe que as alterações a partir de quimioterápicos incluem degeneração de células epiteliais intestinais, influxo de células leucocitárias no intestino delgado, mais especificamente na lâmina própria, dano aos vasos presentes na porção de tecido conjuntivo da submucosa, definhamento das projeções intestinais (vilosidades), além de apoptose e formação incompleta ou defeituosa (hipoplasia) das criptas intestinais. Essas alterações histopatológicas culminam com os sintomas comumente observados nos pacientes sob condições de tratamento com quimioterápicos como, por exemplo, diarreia, dor abdominal, sangramento, desidratação e infecções com complicações potencialmente fatais (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Duas teorias são aceitas quanto a etiologia da mucosite. A primeira, denominada mucosite direta, trata da interferência citotóxica do quimioterápico sobre as células do trato gastrointestinal; a segunda, denominada mucosite indireta, fala sobre a susceptibilidade às infecções oportunistas, especialmente causadas por bactérias Gram-negativas e fungos, devido à neutropenia por citotoxicidade causada pelo quimioterápico às células da medula óssea (RAMANA *et al.*, 2006).

O risco para o desenvolvimento de mucosite como consequência do tratamento de neoplasias malignas é agravado a depender de fatores que incluem: doença maligna, a capacidade de defesa e o estado nutricional do paciente (RAMANA *et al.*, 2006).

Qualquer área desde a boca ao ânus pode ser acometida pela mucosite, e quando em sua forma grave gera debilidade ao indivíduo. Os efeitos colaterais causados por fármacos citotóxicos em muitas ocasiões levam a suspensão do protocolo de tratamento do câncer pelo paciente devido a efeitos colaterais (GUSSGARD *et al.*, 2014; LAMBERTZ *et al.*, 2010).

Apesar de demasiado esforço em pesquisa, atualmente não há uma profilaxia ou terapêutica de referência contra a mucosite gastrointestinal, sendo que o tratamento fica focado em aliviar os sintomas do paciente. Um tipo de tratamento nessas ocorrências fica pela conduta do uso de agentes farmacológicos que são capazes de manter o equilíbrio hidroeletrólítico (antidiuréticos) além de utilização da hidratação oral pelo fato de ocorrer desidratação isotônica em pacientes comprometidos pela enfermidade (ESCOTT-STUMP, SYLVIA. MAHAN, 2010; VAN SEBILLE *et al.*, 2015; WARDILL *et al.*, 2019).

A utilização de terapias naturais também tem sido realizada, entre eles a utilização de antioxidante como N-acetil-cisteína e aminoácido glutamina demonstrando efeito positivo na composição da microbiota e redução da toxicidade gerada pela quimioterapia, além da estimulação do metabolismo celular na cripta intestinal por proliferação utilizando baixos níveis de glicose contra diminuição da vilosidade intestinal e atrofia do vilos (VAN SEBILLE *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2018).

2.3 O quimioterápico 5 -Fluorouracil

O 5-Fluorouracil (5-Fu), um antimetabólito da pirimidina, foi sintetizado por Heidelberg e aprovado pela Administração de Medicamentos e Alimentos (FDA – *Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos da América (EUA) em 1950 (FILLER; SAHA, 2009; KAKLAMANI; GRADISHAR, 2003). Sua ação, por apresentar controle tumoral, foi observado pela primeira vez em 1957, também por Heidelberg. Devido ao seu amplo espectro de ação, é o fármaco quimioterápico mais utilizado na prática clínica oncológica para tratamento de vários tipos de neoplasias, incluindo câncer gastrointestinal, câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço, ginecológico, e como tratamento primário para o câncer colorretal (DEVITA; CHU, 2008; DO CARMO *et al.*, 2018; GHIRINGHELLI; APETOH, 2015; LO *et al.*, 2012).

A respeito de sua farmacocinética e farmacodinâmica, o 5-Fu, cujo emprego na prática clínica é exclusivo à administração via parenteral, ao ser ingerido via oral chega ao intestino sendo absorvido parcialmente, adentrando ao sistema porta-hepático como qualquer fármaco ingerido por essa via. Em seguida, o 5-Fu sofre efeito de primeira passagem sendo metabolizado em uma taxa de 80% no fígado via enzima dihidropirimidina-desidrogenase (DPD). A biodisponibilidade do fármaco sofre redução significativa durante esse processo, sendo 15-20% do fármaco é excretado por via urinária (CASALE *et al.*, 2004; FOCACCETTI *et al.*, 2015; MIURA *et al.*, 2010).

Uma das maiores preocupações quanto a utilização do 5-Fu atualmente é a geração de resistência dos tumores ao fármaco levando ao uso de concentrações cada vez mais elevadas. Contudo, por não apresentar especificidade para células neoplásicas malignas, o fármaco induz efeitos adversos como a citotoxicidade em células saudáveis, especialmente as células epiteliais e da medula óssea. Os pacientes que utilizam o 5-Fu evoluem por vezes para

supressão da medula óssea, dermatites, diarreia e cerca de 80% apresentam mucosite (DO CARMO *et al.*, 2018; GHIRINGHELLI; APETOH, 2015; LO *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação do 5-Fu está diretamente relacionado à natureza química entre esse fármaco e a uracila. A uracila é uma base nitrogenada presente nos ácidos nucleicos sendo constituinte do ácido ribonucleico RNA.

Heidelberg observou que em hepatoma de ratos havia grande captação de uracila, e que interferência nessa captação poderia ser alvo do controle tumoral. Para isso foi adicionado um composto do grupo dos halogênios, denominado flúor, na posição 5 da uracila criando assim o composto 5-Fu. (DEVITA; CHU, 2008).

A uracila é uma base nitrogenada incluída no metabolismo do uracil fosfato em timidina, via enzima timidilato sintase. Nesse processo o 5-Fu é capaz de impedir a metilação da uracila impedindo sua síntese. O 5-Fu também é capaz de interromper a síntese de DNA na fase S do ciclo celular inibindo a conversão enzimática de dUMP em dTMP onde o desequilíbrio destes desoxinucleotídeos causa dano direto ao DNA da célula em divisão (ANNA HAGENKORT, 2016; BANERJEE *et al.*, 2017; LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

A partir do estudo realizado por Yotsumoto e colaboradores (2017), foi demonstrado que a utilização de 5-Fu é capaz de causar dano em transportadores intestinais como PEPT1 e P-gp por alterar seus níveis de expressão, afetando dessa maneira a absorção de fármacos de maneira oral e sua eficácia farmacológica.

A patogênese da mucosite intestinal induzida por quimioterápico não está completamente compreendida porém alguns indicadores já foram hipotetizados como no caso do 5-Fu, dentre eles: apoptose das células intestinais pela produção de espécies reativas de oxigênio, aumento da expressão de NF-kb de maneira secundária ao estresse oxidativo, formação de citocinas dependentes de inflamassomas durante o processo de MIQ, passagem de grande concentração de leucócitos para dentro da lâmina própria mediada por citocinas TNF- α , IL-4, IL-6 e as quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CXCL4 (LO *et al.*, 2012; MENEZES- GARCIA *et al.*, 2018; NAHLA HAMOUDA., 2017).

2.4 Quimioterapia e infecções oportunistas

Ao se tratar de infecções oportunistas, é importante entender que se tratam de microrganismos que normalmente não causariam infecções, porém devido à debilidade e falha no sistema imune inato e adaptativo do indivíduo imunocomprometido, este é capaz de se aproveitar da situação do organismo levando a infecções potencialmente fatais. (BAJAJ; TOMBACH, 2017; JOSÉ; BROWN, 2016).

O comprometimento imune está relacionado a fatores como idade, estado nutricional, ao tumor, tipo histológico ou ao tratamento da neoplasia maligna, que serão facilitadores para a susceptibilidade a infecções oportunistas (BAJAJ; TOMBACH, 2017; FABER *et al.*, 2011).

As infecções oportunistas aumentam a morbidade e a mortalidade nas doenças oncológicas e, pacientes imunocomprometidos são susceptíveis a invasão de microrganismos. A afecção infecciosa mais comumente encontrada no paciente oncológico é a pneumonia adquirida na comunidade (ALIBERTI *et al.*, 2009).

Como grande parte dessas infecções tem como alvo o pulmão, os exemplos em muitas circunstâncias são: pneumonia aspirativa em ambientes hospitalares, pneumonia por fungos como *Candida spp.*, pneumonia bacteriana causada por micobactérias e ainda, as pneumonias virais causadas pelos vírus da gripe, rinovírus, coronavírus que são capazes de predispor o indivíduo a uma infecção bacteriana secundária (JOSÉ; BROWN, 2016).

O estudo de revisão retrospectiva realizado por Quinn (2018) analisou dados a partir de 21 hospitais nos Estados Unidos chegando à conclusão que mesmo os pacientes mais jovens não possuíam atendimento profilático contra a pneumonia, com dados de que 70,8% das infecções por pneumonia em hospital sem uso de ventilação foi adquirida fora da UTI. A crescente prevalência de bactérias Gram-negativas nesses ambientes de pacientes gravemente enfermos trouxe consigo outra problemática, bactérias que possuem resistoma específico a diversas classes de medicamentos (CERCEO *et al.*, 2016).

O resistoma de bactérias oportunistas confere a esses microrganismos uma série de vantagens dentre elas a capacidade de efluxo de drogas, incorporação de material genético ou alteração na expressão gênica por prévio uso de uma concentração insuficiente de antimicrobiano para eliminar o microrganismo. Tal situação quando atinge os pacientes sob tratamento quimioterápico acarreta na piora dos sintomas e prognóstico prolongando sua estadia hospitalar no qual os efeitos colaterais muitas vezes podem se estender (CERCEO *et al.*, 2016; CHOI; LEE; ERNST, 2015). A leucopenia é uma consequência comum dos tratamentos baseados no uso de quimioterápicos. Uma contagem de leucócitos circulantes <2.000 células/mm³ de sangue periférico caracteriza uma leucopenia, o que aumenta a susceptibilidade para infecções causadas por microrganismos oportunistas. Um dos efeitos dessa supressão pode estar relacionado ao mecanismo de retroalimentação das sinalizações inflamatórias geradas pelos quimioterápicos que estimulam mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em situações de estado inflamatório sistêmico causado pela mucosite (FABER *et al.*, 2011).

Em consequência da mucosite no trato gastrointestinal, o uso de quimioterápicos pode causar a perda física da barreira epitelial ligada a degeneração dos enterócitos, que favorece a translocação de microrganismos do lúmen intestinal para outros tecidos (MONTASSIER *et al.*, 2015). Ao discutir sobre as principais complicações da mucosite, especialmente em pacientes com neutropenia, é possível constatar certa predisposição para eventos de bacteremia, e/ou fungemia (AMMANN *et al.*, 2015; MOUGEOT *et al.*, 2019). As bactérias Gram-negativas representam 60~65% das infecções presentes em pacientes em tratamento de neoplasias malignas e estão associadas ao aumento da morbidade e mortalidade de doenças avançadas (FABER *et al.*, 2011).

2.5 *Pseudomonas aeruginosa* e infecções oportunistas

Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas são encontradas em doenças infecciosas em pacientes oncológicos. A *Staphylococcus aureus* é a bactéria Gram-positiva mais comumente encontrada. Do grupo das bactérias Gram-negativas os grupos bacterianos mais comuns incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* e *P. aeruginosa* (FABER *et al.*, 2011).

A espécie *P. aeruginosa* é uma bactéria extracelular, Gram-negativa, aeróbia, não fermentadora de glicose e não formadora de esporos, pertencente à família *Pseudomonadaceae* (NILE *et al.*, 2015). Essa bactéria é extensamente distribuída na natureza, principalmente em lugares úmidos e tem uma ampla capacidade de conservar-se em superfícies inertes, portanto, vários locais podem atuar como reservatórios desse microrganismo (DUBOIS *et al.*, 2001; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). O estudo de Turner e colaboradores (2014) demonstrou a capacidade infecciosa desse organismo, onde sua expressão gênica é capaz de interferir em sua virulência e aptidão em causar infecções de caráter agudo ou crônico em diferentes tipos de tecido.

A estirpe PA14 da *P.aeruginosa* é classificada como altamente virulenta e uma de suas características de virulência está relacionada a um eficiente sistema de secreção, classificado como do tipo III ou T3SS, capaz de injetar toxinas de natureza proteica no hospedeiro. Outra particularidade dessa estirpe é o sistema RetS / LadS / GacS envolvidos na formação de biofilmes. RetS é um sensor que ativa de maneira negativa a formação de biofilme e regula o T3SS, já LadS, uma quinase responsiva ao cálcio, foi identificada por apresentar uma mutação nessa estirpe agindo de maneira contrária a RetS, ativando a formação de biofilme e impedindo a secreção por T3SS. Esse complexo mecanismo

é essencial para a alteração da virulência de caráter agudo para crônico. Outro mecanismo de sinalização identificado é o de *quorum sensing*, que permite adaptação ambiental e controle populacional onde a bactéria está inserida. O *quorum sensing* é mediado por moléculas de membrana com a capacidade de secretar hemolisinas e proteases gerenciando a regulação gênica de células hospedeiras favorecendo a sobrevivência dessa bactéria em diversos ambientes, inclusive pulmonar, auxiliando a formação de biofilmes (BRODER; JAEGER; JENAL, 2016; GELLATLY; HANCOCK, 2013; MIKKELSEN; MCMULLAN; FILLOUX, 2011).

A espécie *P. aeruginosa* é um patógeno caracterizado como oportunista do ser humano por fatores multifatoriais e combinatórios. Após ser adquirida do meio ambiente, essa bactéria coloniza o epitélio do trato respiratório em pacientes com condições predisponentes, como fibrose cística, ventilação mecânica, imunodeficiência ou doença respiratória preexistente, sendo responsável por uma ampla gama de infecções hospitalares (DUBOIS *et al.*, 2001; KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

A fibrose cística (FC) , uma mutação que tem como alvo o gene *CFTR* (regulador de condutância transmembranar de fibrose cística) é caracterizada por acúmulo de muco nos pulmões, tendo como principais sintomas a falta de ar, hipertensão pulmonar, respiração sibilante entre outros sintomas sistêmicos também descritos em literatura. A presença da *P. aeruginosa* em enfermidades como a FC altera o muco presente no tecido pulmonar, que já não possui fluidez devido à alteração do receptor CFTR que realiza a passagem de cloreto e sódio de maneira intracelular e extracelular. Como consequência, constata-se infiltração vigorosa de neutrófilos no pulmão que realiza liberação de proteases sendo responsáveis pela destruição tecidual (DE BENTZMANN; PLÉSIAT, 2011; RAFEEQ; MURAD, 2017).

Por ser caracterizada como uma bactéria extracelular, a espécie *P. aeruginosa* é capaz de se replicar fora das células hospedeiras, por exemplo, no sangue, em tecidos conjuntivos, e nos espaços teciduais, como os lúmens das vias aéreas e do trato gastrintestinal (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Para o reconhecimento dessas bactérias extracelulares são utilizados pelos fagócitos receptores de superfície (manose e *scavenger*), tendo como objetivo proporcionar a fagocitose dessas bactérias. Esses receptores, por sua vez, utilizam receptores do sistema complemento e receptores Fc para reconhecer bactérias opsonizadas com proteínas do sistema complemento e anticorpos, respectivamente.

Ademais, os receptores do tipo *Toll* (TLRs) são ativados por produtos microbianos, e ele estimula nos fagócitos atividades inflamatórias. Os TLRs também podem mediar as respostas aos componentes da matriz de biofilmes produzidos por essa bactérias (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). Em adição, as células dendríticas e os fagócitos que são

ativadas pelos microrganismos secretam citocinas que induzem a infiltração leucocitária nos locais de infecção, resultando na destruição das bactérias pelos leucócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As células T CD4+ auxiliares também são ativadas por antígenos proteicos da *P. aeruginosa*. Isso acontece porque os anticorpos sozinhos não são capazes de eliminar o patógeno, assim a imunidade mediada por células T é importante para pacientes infectados pela *P. aeruginosa* (BAYES *et al.*, 2014). Os antígenos protéicos de bactérias extracelulares que ativam as células T CD4+ auxiliares, estimulam a produção de citocinas que induzem inflamação local, aumentam as atividades fagocíticas e microbicidas de macrófagos e neutrófilos e estimulam a produção de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Tanto as células T CD4+ quanto as células T CD8+ ativadas produzem as citocinas pró inflamatórias na tentativa de conter o processo infeccioso (LAVOIE; WANGDI; KAZMIERCZAK, 2011).

Os pacientes com câncer, principalmente os imunocomprometidos, são susceptíveis a infecção pela bactéria oportunista *P. aeruginosa*. Nestes casos, graves infecções podem ocorrer afetando mucosa do trato respiratório e trato gastrointestinal. Logo, a resposta imune exacerbada contra essa bactéria pode acarretar danos teciduais no hospedeiro com intensa inflamação nos locais onde a *P. aeruginosa* pode colonizar. Além disso, a deficiente função de barreira epitelial, induzida pela mucosite, predispõe à uma maior ocorrência das infecções oportunistas e o risco de translocação bacteriana para a corrente sanguínea (bacteremia) (FABER *et al.*, 2011), com desfechos catastróficos com relação ao prognóstico do paciente.

3 JUSTIFICATIVA

A mucosite é uma afecção que prejudica o prognóstico do paciente oncológico. Diante da inflamação, o paciente tem desde problemas para ingestão de alimentos ou líquidos, quanto alterações absortivas ligadas aos danos no trato gastrointestinal (RAMANA *et al.*, 2006). Essas alterações histopatológicas, presentes na mucosite, culminam com os sintomas comumente observados nos pacientes em tratamento com quimioterápicos como, por exemplo, diarreia, dor abdominal, sangramento, desidratação e infecções com complicações potencialmente fatais (RIBEIRO *et al.*, 2016). Acrescentado a isto, alterações do estado nutricional dos pacientes impacta a resposta corporal aos diferentes estressores. Existem casos em que o tratamento deve ser interrompido e isto impacta no prognóstico do paciente e nos gastos de saúde pública (RAMANA *et al.*, 2006).

Além disso, os pacientes com mucosite ficam expostos a infecções oportunistas pela facilidade de translocação bacteriana na inflamação das mucosas e podem infectar outros tecidos (FABER *et al.*, 2011). Nos casos em que há leucopenia, infecções oportunistas, como as causadas por *P. aeruginosa*, causam graves infecções no trato respiratório e gastrointestinal. Infecções oportunistas estão relacionados com o aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes oncológicos (ALIBERTI *et al.*, 2009). Sendo assim, avaliar a resposta murina em modelo de mucosite induzida por quimioterápico contra a *P. aeruginosa* e caracterizar a microbiota intestinal pode auxiliar na elucidação da importância da microbiota residente e o padrão de resposta contra bactérias em situação de inflamação grave e, futuramente, utilizar os conhecimento para possibilitar novas abordagens translacionais, saindo do modelo murino para futuros estudos de situações de infecções oportunistas no ser humano sob condições de quimioterapia causadora de mucosite e disbiose intestinal.

4 OBJETIVOS

Neste tópico serão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos deste trabalho.

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta do hospedeiro murino frente à infecção pela bactéria oportunista *Pseudomonas aeruginosa* em modelo de mucosite induzida pelo quimioterápico 5-Fluorouracil (5-Fu).

4.2 Objetivos Específicos

- a) Induzir a mucosite gastrointestinal murina utilizando o fármaco 5-Fu;
- b) Avaliar a microbiota intestinal de camundongos sob condições de mucosite induzida por 5-Fu;
- c) Infectar intratraquealmente camundongos sob condições de mucosite induzida por 5-Fu com a bactéria oportunista *P. aeruginosa*;
- d) Avaliar histopatologicamente os pulmões e a mucosa intestinal de animais infectados com a *P. aeruginosa* em condições de mucosite induzida por 5-Fu;
- e) Analisar a expressão de *TNF- α* e *iNOS* nos pulmões e no baço de camundongos sob condições de mucosite induzida por 5-Fu e infectados pela *P. aeruginosa*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Neste tópico será descrita a metodologia utilizada no desenvolvimento do presente trabalho.

5.1 Animais e indução da mucosite

Os animais utilizados nesse projeto são camundongos da linhagem BALB/c provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos em biotério sob condições controladas de temperatura e limpeza, alimentação baseada em água e ração *ad libitum*. Os protocolos de experimentação seguiram os preceitos do ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (KILKENNY *et al.*, 2010) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL- MG (CEUA-UNIFAL) sob o número 08/2019.

Cinco animais por grupo foram utilizados e distribuídos da seguinte forma: Grupo 1 – PBS/Não infectado; Grupo 2: PBS/Infectado; Grupo 3: 5-Fu/Não infectado; Grupo 4: 5-Fu/Infectado. Estes animais receberam durante três dias consecutivos uma dose intraperitoneal de 100mL de solução salina estéril (PBS/Não infectado e PBS/Infectado) ou 50 mg/kg de 5-Fluorouracil (5-Fu) (5-Fu/Não infectado e 5-Fu/Infectado) para indução da mucosite de acordo com o protocolo de Li e colaboradores (2017). O peso corporal e a consistência fecal foram verificados diariamente para avaliação da mucosite. O grau de diarreia foi avaliado baseado na consistência fecal usando os parâmetros descritos por Li e colaboradores (2017): 0, normal; 1, ligeiramente úmido; 2, moderadamente úmido; 3, formato indefinido; 4, fezes aquosas.

5.2 Curva de proliferação de *P. aeruginosa*

Para avaliar o crescimento e determinar a quantidade ideal de bactérias que seria utilizada durante o processo de experimentação, a densidade ótica para contagem de UFCs da estirpe PA14 foi avaliada em comprimento de onda de 600nm (DO600) em cubetas de quartzo por espectrofotômetro (BEL PHOTONICS 2000 UV).

O preparo do inóculo para leitura foi realizado na proporção de 500uL de cultura previamente congelada em 20ml de Luria Bertani (LB) incubadas a 37 °C em agitador horizontal sob 180 rotações por minuto (rpm). Após o inóculo das estirpes em meio LB, 1 mL da cultura foi retirado de tubo Falcon para medição da DO600. Esta etapa foi repetida ordenadamente a 1, 4, 8 e 12 horas de incubação do meio inoculado com a estirpe PA14, a leitura da densidade ótica foi realizada após 8 horas. Posteriormente 1ml do meio contendo a bactéria foi diluído em outro frasco contendo LB para realização de outra curva de proliferação simultaneamente.

Um frasco contendo meio LB estéril foi utilizado ao longo do experimento para leitura em branco no espectrofotômetro nos momentos de avaliação da DO600. Para cálculo de determinação da curva de proliferação da *P. aeruginosa* PA14, foram utilizados os valores da DO600, UFCs e tempo de inóculo. De acordo com estudos prévios do nosso grupo de trabalho, a DO 600=0,5 equivale à $1,5 \times 10^8$ UFC e caracteriza o meio da fase exponencial de crescimento da PA14 (TANA *et al.*, 2017).

5.3 Cultivo das estirpes de *P. aeruginosa*

Para realização do cultivo da estirpe virulenta PA14 de *P. aeruginosa*, utilizada no experimento *in vivo* neste trabalho, realizou-se descongelamento de um frasco contendo 500ul de cultura da estirpe pertencente ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas, que posteriormente foram inseridas em 20mL de meio Luria Bertani (LB) para posterior agitação constante de 180 rotações por minuto e temperatura controlada de 37 °C.

A partir da curva de proliferação previamente descrita, a fase de crescimento exponencial da bactéria (fase log) por um período de dez horas nos permitiu obter uma quantidade 1×10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) adequada para a infecção dos animais Balb/c em experimentação.

5.4 Infecção pela bactéria *P. aeruginosa*

Os animais pertencentes aos grupos PBS/infectado e 5-Fu/Infectado, foram anestesiados com aproximadamente 0,1 mL de solução anestésica composta por 260 uL de Quetamina 10%, 130 ul de Xilasina [2.3g] e 1110 uL de salina estéril. Em seguida, a traquéia dos animais foi exposta e inoculada com 1×10^5 unidades formadoras de colônia (1×10^5 UFCs). Após o procedimento, realizou-se sutura da pele anterior à traqueia por material cirúrgico previamente autoclavado e os animais retornaram ao biotério. Dez horas após a infecção, os camundongos foram eutanasiados com dose letal 1:1 da solução estoque de anestésicos Quetamina (10%) e Xilasina (2%) seguido por deslocamento cervical com posterior remoção de fragmentos do pulmão, ceco e fígado para análise histopatológica, e fragmentos do pulmão, fígado e baço para contagem de UFC de bactérias viáveis nos tecidos, além de realização da expressão diferencial de *iNOS* e *TNF- α* em pulmão e baço.

5.5 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs)

Os fragmentos de pulmão, fígado e baço extraídos dos animais Balb/c foram macerados em 9 mL de salina estéril, e diluídos serialmente. O pulmão foi diluído a 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , o baço e fígado foram diluídos a 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . As diluições foram plaqueadas em ágar Luria Bertani (LB). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24 horas e realizada a contagem de UFCs. Os resultados foram expressos como log de UFC/órgão do pulmão, baço e fígado de cada animal.

5.6 Extração de RNA total

Para análise da expressão diferencial de genes *iNOS* e *TNF- α* , o RNA total dos tecidos pulmão e baço provenientes de camundongos PBS/infestado ou 5-Fu/Infestado foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) a partir das instruções informadas pelo fabricante. Brevemente, as amostras com Trizol foram homogeneizadas e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se clorofórmio, homogeneizou-se, e as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 rpm. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um tubo estéril. O RNA total foi precipitado em isopropanol por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi então descartado, e o precipitado lavado com etanol 75%. Por fim, o RNA total foi eluído em água livre de RNase. Após a extração, o RNA total foi quantificado em Nanodrop (ThermoScientific, USA) a 260 nm e armazenado a -80 °C até ser utilizado.

5.7 Síntese de cDNA a partir de reação mediada por transcriptase reversa

A síntese de cDNA fita simples foi realizada de acordo com os dados do fabricante utilizando o kit IllustratTM Ready-to-GoTM RTPCR Beads (GE Healthcare) que dispõe de enzima transcriptase reversa, dNTPs, tampão MgCl₂, Tris HCl e KCl. Primeiramente, foram inseridos 1 uL de oligo(dT) em conjunto a 1µg de RNA obtidos a partir dos macerados de pulmão e baço de animais PBS/infestado e 5-Fu/Infestado e H₂O/RNase free (q.s.p. 49 µL).

O RNA total foi quantificado em equipamento Qubit. As amostras foram posteriormente transportadas para termociclador Geneamp pcr system 9700 a 42°C por 30 minutos, 95°C por 5 minutos e 4°C ∞. Após a conclusão da reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA obtidas foram armazenadas a -20°C para análise no dia posterior por PCR em tempo real.

5.8 Análise da expressão diferencial de genes por PCR em tempo real

A análise da expressão diferencial de genes foi realizada a partir de primers específicos previamente desenhados e/ou descritos em literatura tendo como alvos os genes *iNOS* ou *TNF- α* , onde o gene empregado como controle endógeno durante o procedimento foi a *β -actina*, representados na tabela 1. As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando SYBR® Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. Os dados foram analisados conforme o método comparativo do ciclo limiar (Ct), de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e User Bulletin #2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem).

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados nas análises de PCR em tempo real

Prime	Sequência
iNOS F	5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'
iNOS R	5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3'
TNF- α F	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACA-3'
TNF- α R	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACA-3'
β -actina F	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACA-3'
β -actina R	5'-TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT-3'

Fonte:do autor

5.9 Extração de DNA fecal

O DNA total foi extraído de amostras fecais dos grupos experimentais PBS ou 5-Fu de acordo com os dados do fabricante do Mini Kit Stool QEAamp DNA (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EUA). Cinco pellets fecais por grupo coletados assepticamente foram suspensos em solução salina estéril. O InhibitEX Buffer do kit foi utilizado para reduzir os efeitos dos inibidores da reação em cadeia da polimerase (PCR) nas amostras de fezes. O DNA total foi purificado em uma coluna QIAamp e quantificado em fluorímetro Invitrogen Qubit Fluorometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Um nanograma de DNA total por amostra foi utilizado para analisar as sequências de RNA ribossômico 16S (rRNA) por qPCR.

Tabela 2 -Sequência dos primers dos filios bacterianos para análises de PCR em tempo real

Prime	Sequência
Bactérias totais F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Bactérias totais R	5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'
<i>Bacteroidetes</i> F	5'-GTTTAATTCGATGATACGCGAG-3'
<i>Bacteroidetes</i> R	5'-TTAASCCGACACCTCACGG-3'
<i>Proteobacterias</i> F	5'-GCTAACGCATTAAGTRYCCCG-3'
<i>Proteobacterias</i> R	5'-GCCATGCRGCACCTGTCT-3'
<i>Firmicutes</i> F	5'-GGAGYATGTGGTTTAATTTCGAAGCA-3'
<i>Firmicutes</i> R	5'-AGCTGACGACAACCATGCAC-3'

Fonte: do autor

Legenda: Símbolos dos nucleotídeos: R = A ou G; Y= C ou T; W= A ou T; S= C ou G.

5.10 Processamento histológico e processamento de imagens microscópicas

Fragmentos do fígado, pulmão e ceco foram fixados em fixador histológico (formaldeído à 10% em tampão fostafo 0.1M, pH 7.2) durante 48 horas, desidratados em etanol, diafanizados em xileno e emblocados em parafina histológica. Seções de 5µm de espessura foram obtidas utilizando um micrótomo rotativo (Leica Multicut 2045[®], Reichert-Jung Products, Alemanha). As seções foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para a análise histopatológica e microestrutural (GONÇALVES *et al.*, 2012). Para evitar a análise histológica da mesma área histológica, foram realizado cortes 1/20 seções de tecido. As seções foram visualizadas e as imagens foram capturadas usando um fotomicroscópio de campo claro (Axioscope A1, Carl Zeiss, Alemanha). Para cada animal e órgão analisado, dez campos microscópicos foram fotografados aleatoriamente com uma lente objetiva de 40× (NOVAES *et al.*, 2015).

5.11 Análise histopatológica

Para cada órgão foram analisados os seguintes parâmetros histopatológicos: i) Fígado: presença de infiltrado inflamatório, hipertrofia ou hipotrofia de hepatócitos, colapso ou congestão vascular, degeneração celular (hidrópica, esteatose e necrose), expansão do estroma conjuntivo (CUPERTINO *et al.*, 2013; NOVAES *et al.*, 2015); ii) Pulmão: Espessamento de septo alveolar, celularidade tecidual, dilatação e colapso alveolar, focos hemorrágicos e exsudato intra-alveolar (NOVAES *et al.*, 2012; ROCHA PEREIRA *et al.*, 2017); ii) Ceco: Hipertrofia ou atrofia de mucosa, celularidade da mucosa intestinal, organização das criptas intestinais, perfil de distribuição de células caliciformes (SEQUETTO *et al.*, 2013).

5.12 Análise histomorfométrica

A análise microestrutural quantitativa foi realizada com o auxílio do programa de análise de imagens Image Pro-plus 4.5[®] (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, EUA). A distribuição (V_v , densidade de volume [%]) de hepatócitos em degeneração e de capilares sinusóides no fígado, bem como a proporção entre septo e espaço alveolar nos pulmões foi estimada por meio do método estereológico baseado na relação $V_v = \Sigma P_P / P_T$, onde V_v representa o percentual que a estrutura de interesse ocupa na área histológica, ΣP_P representa o número de pontos de teste que incidem sobre a estrutura de interesse, e P_T corresponde ao número total de pontos do sistema de teste (MANDARIM-DE-LACERDA; NOVAES *et al.*, 2012). Para essa análise, foi utilizado um sistema de teste quadrático com 200 pontos (P_T), o qual foi sobreposto às imagens microscópicas para a determinação de ΣP_P (GONÇALVES *et al.*, 2012).

A densidade de número (Q_A) de hepatócitos e células intersticiais no fígado, bem como a celularidade pulmonar foram estimados por meio do princípio estereológico $Q_A = \Sigma I / A_T$, em que ΣI representa o somatório de células contadas na área de teste (A_T) (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Para a contagem de células, um sistema de teste quadrático com $73 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ foi sobreposto à cada imagem microscópica, e os hepatócitos foram desconsiderados na contagem das células intersticiais (NOVAES *et al.*, 2015).

No ceco, a espessura da mucosa intestinal, bem como a distribuição de linfócitos dentro do epitélio de revestimento intestinal foi estimada por meio de planimetria computacional, utilizando as ferramentas de medida linear e área bi-dimensional do software Image Pro-plus 4.5[®] (Media Cybernetcs, Silver Spring, MD, EUA) (DOS SANTOS *et al.*, 2013). Nessa análise, a média da espessura da mucosa (epitélio + lâminas própria + muscular da mucosa) foi calculada para três diferentes pontos (dois laterais e um medial) aferidos em cada imagem histológica. A distribuição de linfócitos intraepiteliais foi estimada em função do número de linfócitos (NL) normalizado pela área total de epitélio de revestimento analisada, mediante a relação $NL = \Sigma L / AE$, em que ΣL representa o número de linfócitos contados proporcionalmente encontrados em cada área epitelial (AE) avaliada. A área epitelial foi mensurada por meio de ferramenta de contorno do mesmo programa de análise de imagens.

5.13 Análises Estatísticas

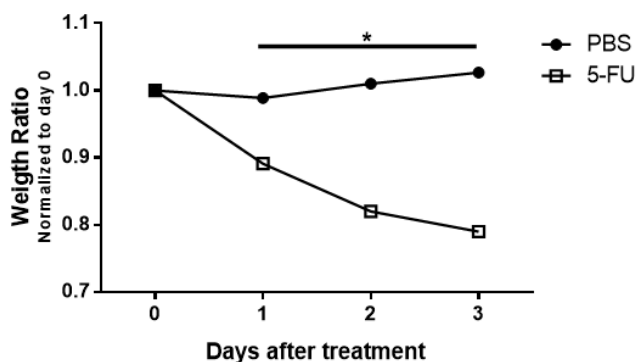
Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP). A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste D'agostino Pearson. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância unifatorial (One-way ANOVA) seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os dados não paramétricos foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados e os gráficos construídos com a utilização do software estatístico GraphPad Prism 6 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA). Cada resultado apresentado é representativo de pelo menos três experimentos independentes.

6 RESULTADOS

6.1 Camundongos sob tratamento com 5-Fu apresentaram mucosite com intensa perda de peso e alteração da consistência fecal.

Os camundongos sob condições de tratamento com 5-Fu apresentaram perda de peso considerável e estatisticamente significativa em relação aos animais tratados somente com o PBS. O índice de peso foi avaliado por meio da normalização entre os grupos tratados com o fármaco quimioterápico (5-Fu/não infectado e 5-Fu/infectado) comparados aos grupos não tratados (PBS/não infectado e PBS/infectado). O peso corpóreo dos animais sob condições de tratamento com o 5-Fu apresentou redução de 11% no primeiro dia de tratamento, 17% no segundo e 20% no terceiro em relação aos animais tratados com solução salina estéril (NT) (Figura 1).

Figura 1- Animais Balb/c sob condições de tratamento com o quimioterápico 5-Fu apresentam expressiva perda de peso quando comparados a animais não tratados (NT).



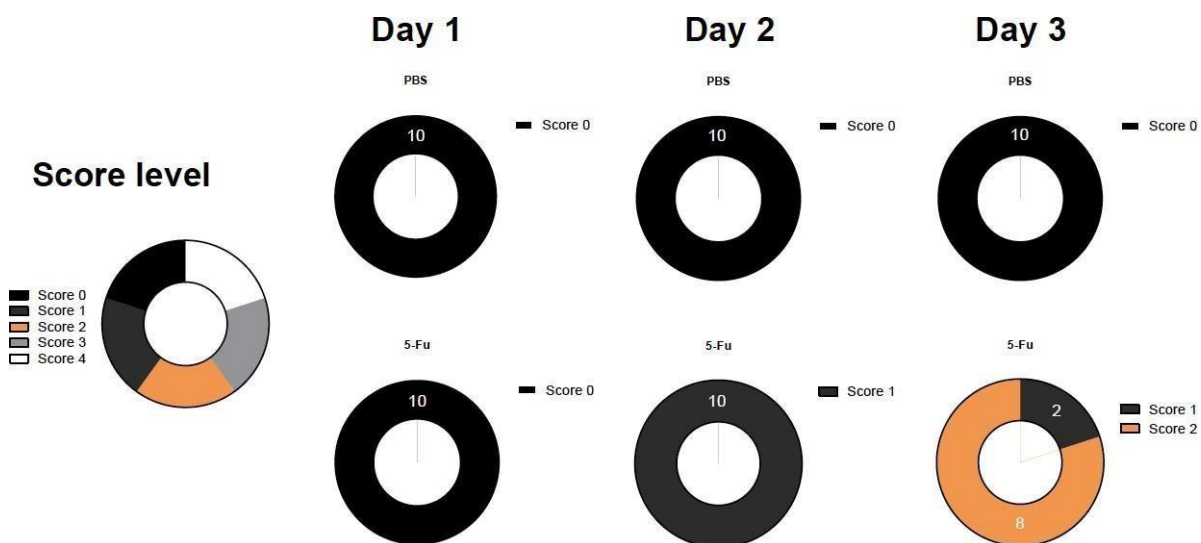
Fonte: Do autor.

Nota: A pesagem dos animais Balb/c foi realizada diariamente sob mesmas condições de temperatura e horário de pesagens. Os dados foram normalizados pela média do grupo desde o primeiro dia. * $p < 0,05$. N=10 animais/grupo. O resultado apresentado é representativo de três experimentos independentes.

G1 – PBS/Não infectado G2 – PBS/Infectado G3 – 5-Fu/Não infectado G4 – 5-Fu/Infectado

As fezes de animais tratados com o fármaco quimioterápico (5-Fu/não infectado e 5-Fu/infectado) se apresentaram ligeiramente úmidas em 100% dos animais no segundo dia de tratamento e 80% apresentaram fezes moderadamente úmidas no terceiro dia sendo representativo do comprometimento da degradabilidade alimentar ao longo do TGI.

Figura 2- Animais Balb/c sob condições de tratamento com o quimioterápico 5-Fu apresentam alteração da consistência fecal quando comparados a animais não tratados (NT).



Fonte: Do autor

Nota: As fezes de animais em tratamento por 5- Fu foram coletadas diariamente por um período de três dias sendo avaliadas segundo os scores: 0, normal; 1, ligeiramente úmido; 2, moderadamente úmido; 3, formato indefinido; 4, fezes aquosas. A partir do dia 1 observou-se início de umidade nas fezes, com elevação da umidade no dia 2. Animais na ausência do tratamento apresentaram fezes normais durante todos os dias. Os dados são apresentados de forma comparativa entre 5-Fu e PBS em relação a cada dia. N=10 animais/grupo. O resultado apresentado é representativo de três experimentos independentes.

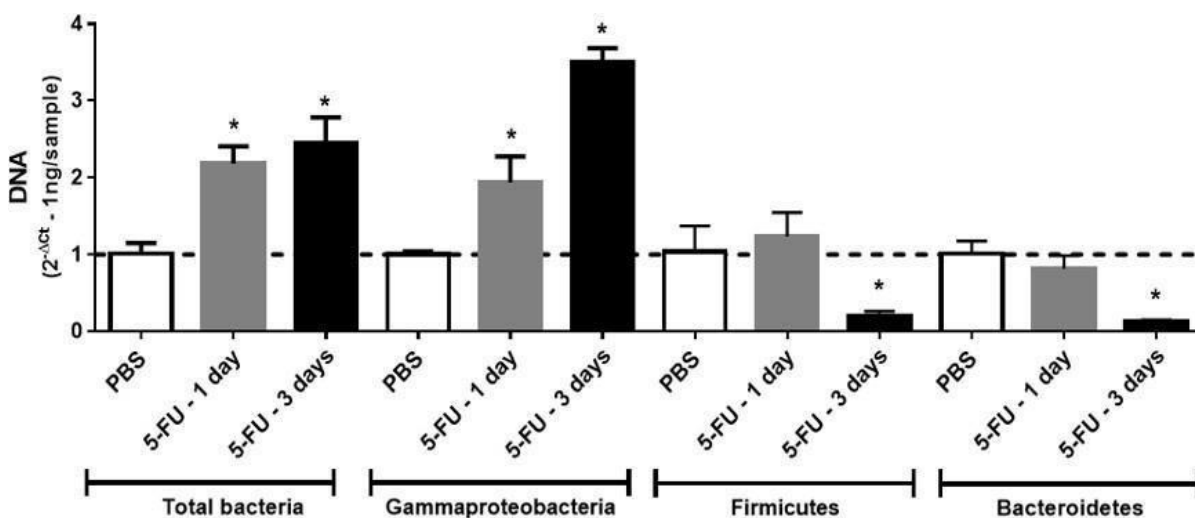
G1 – PBS/Não infectado G2 – PBS/Infectado G3 – 5-Fu/Não infectado G4 – 5-Fu/Infectado

6.2 Animais MIQ apresentam maior quantidade de bactérias totais no conteúdo fecal com aumento expressivo de *Proteobacterias* e diminuição de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*

Ao determinar os parâmetros de peso e de consistência fecal e associá-los à mucosite de acordo com trabalhos anteriores, foi hipotetizado que a mucosite poderia alterar a constituição da microbiota intestinal dos animais. Para isso, foi realizada a análise quantitativa de bactérias totais, assim como mais especificamente as bactérias dos filós *Gammaproteobacterias*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* nas fezes desses animais e comparados com os animais tratados somente com solução salina estéril.

Animais sob regime de tratamento quimioterápico exibiram um aumento na quantidade de bactérias totais no primeiro e terceiro dia a partir da análise de DNA de amostras fecais normalizada em quantidade de 1ng/amostra por RT-qPCR coletadas durante tratamento. O filo bacteriano referente às *Gammaproteobacterias* aumentou após 24h e 72h de tratamento com o 5-Fu. Por outro lado, os filós de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* foram reduzidos após 72h de 5-Fu (Figura 3).

Figura 3- Animais tratados com 5-Fu apresentam maior quantidade de bactérias totais no conteúdo fecal com aumento expressivo de *Proteobacterias* e diminuição de *Bacteroidetes* e *Firmicutes*.



Fonte: Do autor.

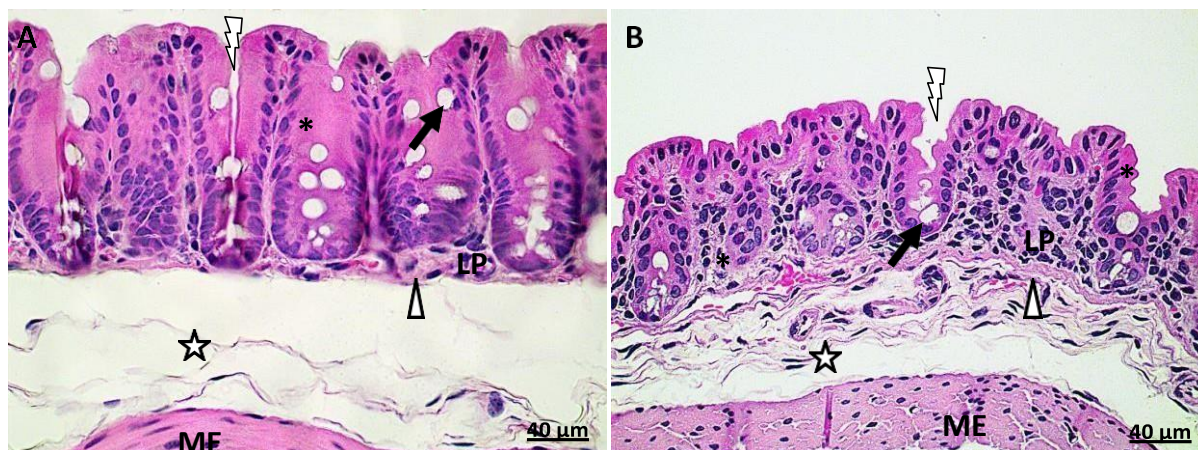
As fezes de animais tratados com 5-Fu foram maceradas e a quantidade total de DNA foi normalizada para análise quantitativa de bactérias totais e dos filós *Gammaproteobacterias*, *Bacteroidetes* e *Firmicutes* por RT-qPCR. Os resultados estão expressos a partir da análise relativa da quantidade de DNA pela equação $2^{-\Delta CT}$ em relação ao grupo PBS (calibrador). * $p < 0,05$ em relação a PBS. N=5 animais/grupo. O resultado apresentado é representativo de três experimentos independentes.

G1 – PBS/Não infectado G2 – PBS/Infectado G3 – 5-Fu/Não infectado G4 – 5-Fu/Infectado

6.3 Animais MIQ apresentam alterações histológicas na mucosa intestinal com aumento da concentração de células inflamatórias e desarranjo na arquitetura cecal

Uma vez que houve diferença na constituição bacteriana fecal nos animais sob MIQ e que a mucosite acarreta em alterações na mucosa dos animais, foi realizada avaliação histopatológica do ceco de animais sob tratamento com o 5-Fu e comparados aos animais que receberam PBS, comprovando a presença de mucosite. Foram observadas alterações entre o grupo tratado com o fármaco quimioterápico (5- Fu/Não infectado) comparado ao grupo não tratado (PBS/Não infectado). Os fragmentos de ceco corados com hematoxilina e eosina mostraram que os animais do grupo PBS/Não infectado e PBS/Infectado apresentaram organização morfológica típica da parede do ceco. Nesses grupos, foram identificados epitélio de revestimento e criptas intestinais bem definidas, distribuição e morfologia normal de enterócitos e células caliciformes, bem como reduzida distribuição de linfócitos intraepiteliais. Nos grupos 5-Fu/Não infectado e 5-Fu/Infectado, foi observada atrofia da mucosa, criptas com morfologia irregular, bem como mucosite representada pela elevada celularidade na mucosa e na distribuição de linfócitos intraepiteliais (Figura 4).

Figura 4- Análise histopatológica do ceco de camundongos PBS/Não infectados e 5-Fu/Não infectados.



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) PBS/não infectado: organização histológica normal com epitélio de revestimento e criptas intestinais bem definidas, distribuição e morfologia normal de enterócitos e células caliciformes, bem como reduzida distribuição de linfócitos intraepiteliais. (B) tratados com quimioterápico 5-Fu: atrofia da mucosa, criptas com morfologia irregular, elevada celularidade na mucosa e na distribuição de linfócitos intraepiteliais (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina) Barras (40 μm). Fotomicrografia de um corte histológico do ceco de um animal representativo do grupo 1 e grupo 3 (N=5 animais por grupo).

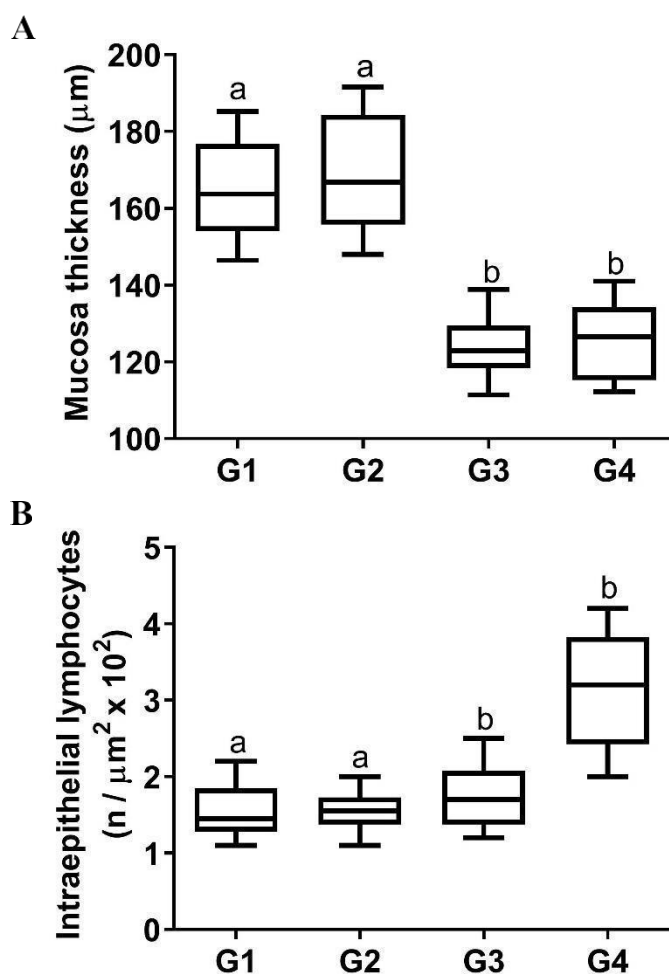
↕ = Cripta de Lieberkühn, ↗ = Célula caliciforme, Δ = Camada muscular da mucosa, ☆ = Camada submucosa,

LP = Lâmina própria, * = Enterócito, ME = Muscular externa.

G1 – PBS/Não infectado G2 – PBS/Infectado G3 – 5-Fu/Não infectado G4 – 5-Fu/Infectado

A avaliação morfométrica do ceco (Figura 5) corroborou os achados histopatológicos de hipertrofia da mucosa intestinal nos grupos 5-Fu/Não infectado e 5-Fu/Infectado, que apresentaram espessura similar e menor em relação aos grupos PBS/Não infectado e PBS/Infectado ($P<0,05$). Além disso, o número de linfócitos intraepiteliais foi significativamente aumentado no grupo 5-Fu/Infectado comparado aos demais grupos ($P<0,05$).

Figura 5- Animais MIQ apresentam menor espessura da mucosa e maior quantidade de linfócitos intraepiteliais quando comparados a animais não tratados (NT).



Fonte:Do autor.

Legenda: (A) Gráfico da espessura da mucosa intestinal dos cecos dos camundongos (B) Gráfico da quantidade de linfócitos intraepiteliais dos cecos dos camundongos . a,b,c,d Diferentes letras entre os grupos indica diferença estatística entre os grupos ($P<0,05$). N=5 animais por grupo

G1 – PBS/Não infectado G2 –PBS/Infectado G3 –5-Fu/Não infectado G4 –5-Fu/Infectado

6.4 Animais MIQ são mais suscetíveis à disseminação da *P. aeruginosa*

Uma vez que há alteração na constituição bacteriana fecal dos animais tratados com 5-Fu com alterações histopatológicas na mucosa intestinal e que há evidências da relação entre alterações no intestino que influenciam na resposta imune contra infecções pulmonares (ROSA *et al.*, 2018), foi realizado o desafio intratraqueal de animais sob condições de mucosite com a bactéria oportunista *P. aeruginosa*.

Ao retorno da anestesia e analgesia dos animais após o desafio intratraqueal com a bactéria, foi observado que os animais do grupo 5-Fu/infectado apresentavam-se com aparente frequência respiratória elevada em relação aos animais PBS/infectados.

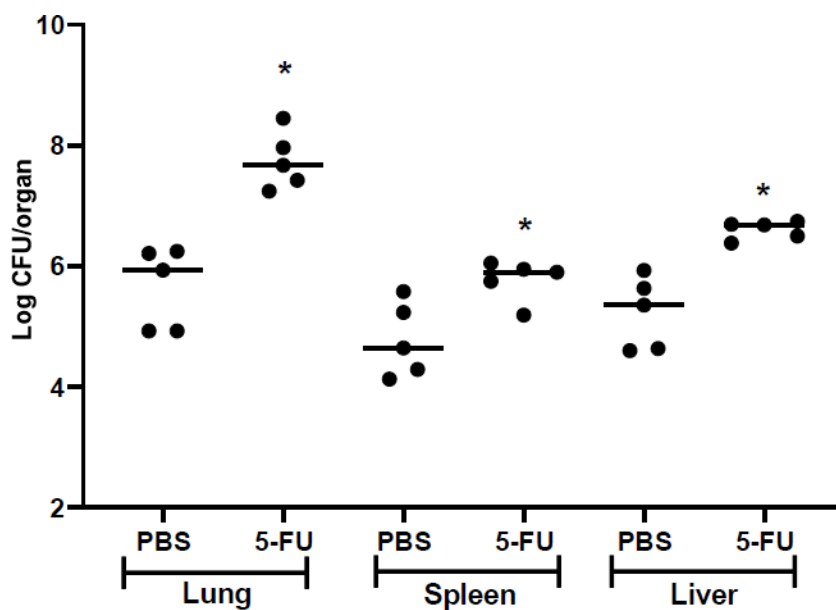
Dez horas após a infecção, os animais foram eutanasiados e a quantidade de bactérias viáveis no pulmão desses animais foi avaliada. A partir da contagem do crescimento de colônias bacterianas em placa, foi possível avaliar que os animais sob condições de mucosite causada pelo 5-Fu são mais suscetíveis à infecção e disseminação da *P. aeruginosa*. Uma maior quantidade de bactérias foi recuperada no pulmão, baço e fígado do grupo 5-Fu/infectado em relação ao grupo PBS/infectado, demonstrando, inclusive, que ocorreu a disseminação bacteriana no decorrer do período de 10 horas para outros sítios além do órgão alvo da infecção (Figura 6).

Apesar das análises *in vivo* demonstrarem que bactérias viáveis da estirpe PA14 foram recuperadas do pulmão dos animais de ambos os grupos infectados, os camundongos 5-Fu/infectado apresentaram maior dificuldade em combater o patógeno, com uma recuperação média de 7,8 log de UFC, comparado ao grupo PBS/infectado com média 5,9 log de UFC.

No baço a recuperação de bactérias viáveis no grupo 5-Fu/infectado apresentou média de 5,8 log de UFC, e o grupo PBS/infectado 4,7 log de UFC. Já no fígado dos animais do grupo 5-Fu/infectado similarmente obteve diferença média de 6,7 log de UFC em comparação a 5,5 log de UFC do grupo PBS/infectado.

Ao realizar uma análise comparativa, o grupo 5-Fu/infectado apresentou diferença média de 1,2 - 1,9 log de UFC vezes entre os órgãos avaliados comparativamente ao PBS/infectado (Figura 6).

Figura 6- Animais sob condições de mucosite induzida pelo 5-Fu são mais suscetíveis à infecção pulmonar pela *P. aeruginosa*.



Fonte: Do autor.

Nota: O pulmão, o baço e o fígado de animais infectados intratraquelmente com 1×10^5 UFCs da estirpe PA14 de *P. aeruginosa* foram recuperados 10 horas após a infecção e foi feita a contagem de UFCs viáveis pela técnica de *pour-plate*. Os dados foram transformados em valores de log de UFC por órgão. * $p < 0,05$.

N=10 animais/grupo. O resultado apresentado em LOG UFC/1g de órgão e é representativo de três experimentos independentes.

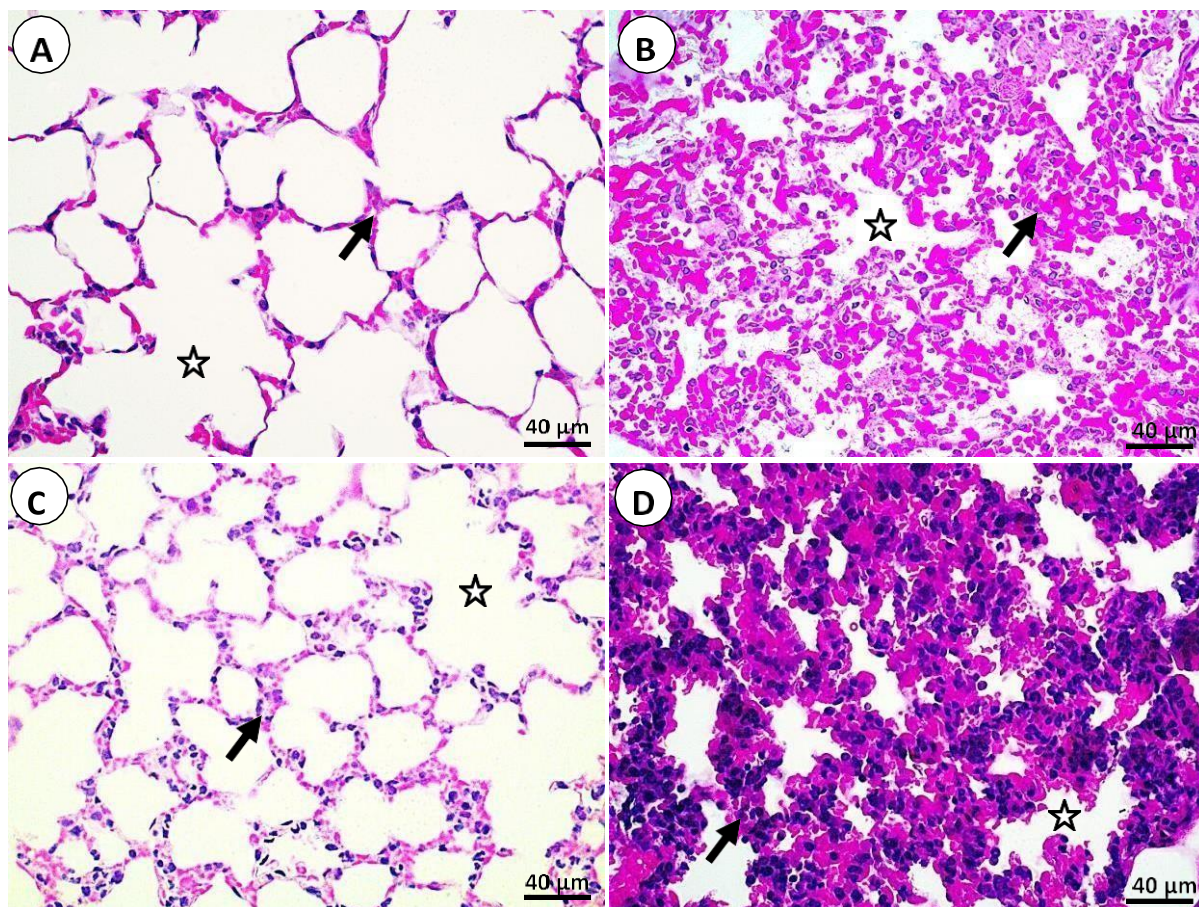
G1 -PBS/Não infectado G2 -PBS/Infectado G3 -5-Fu/Não infectado G4 -5-Fu/Infectado

6.5 Animais MIQ apresentam maiores danos teciduais durante a infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa*.

As análises histopatológicas foram realizadas com amostras de fígado e pulmão de animais MIQ e PBS, a partir da infecção pela *P. aeruginosa* após 10 horas de infecção, sendo observadas alterações entre os grupos tratados com o fármaco quimioterápico (5-Fu/não Infectado e 5-Fu/infectado) e PBS/infectado. Os resultados foram concordantes com a quantidade de bactérias viáveis nos órgãos dos grupos infectados. Quanto maior a quantidade de bactérias recuperadas nos tecidos maiores danos teciduais foram observados. A análise morfológica pulmonar indicou que os animais do grupo PBS/não infectado apresentaram organização microestrutural normal, apresentando baixa celularidade, delgados septos alveolares, luz alveolar desobstruída e bem definida, e bordas alveolares de perfil anguloso. No grupo 5-Fu/não Infectado, os animais apresentaram aumento da celularidade pulmonar e discreto espessamento septal e estreitamento da luz alveolar. Os animais dos grupos PBS/infectado e 5-Fu/infectado apresentaram intenso infiltrado inflamatório, espessamento de septos alveolares, estreitamento da luz alveolar, e marcante congestão vascular (Figura 7).

A análise estereológica do pulmão (Figura 8) indicou que os animais dos grupos PBS/infectado, 5-Fu/não Infectado e 5-Fu/infectado apresentaram aumento da celularidade pulmonar, expansão da área de septo e estreitamento proporcional da luz alveolar comparados ao grupo PBS/não infectado ($P < 0,05$). Esses parâmetros foram mais elevados no grupo PBS/infectado comparado ao grupo 5-Fu/não Infectado ($P < 0,05$), e 5-Fu/infectado comparado a todos os demais grupos ($P < 0,05$).

Figura 7- Análise histopatológica do pulmão de camundongos PBS/não infectados, PBS/infectados, 5-Fu/não infectados, 5-Fu/infectados analisados 10 horas após a infecção com a estirpe PA14 de *P. aeruginosa*.



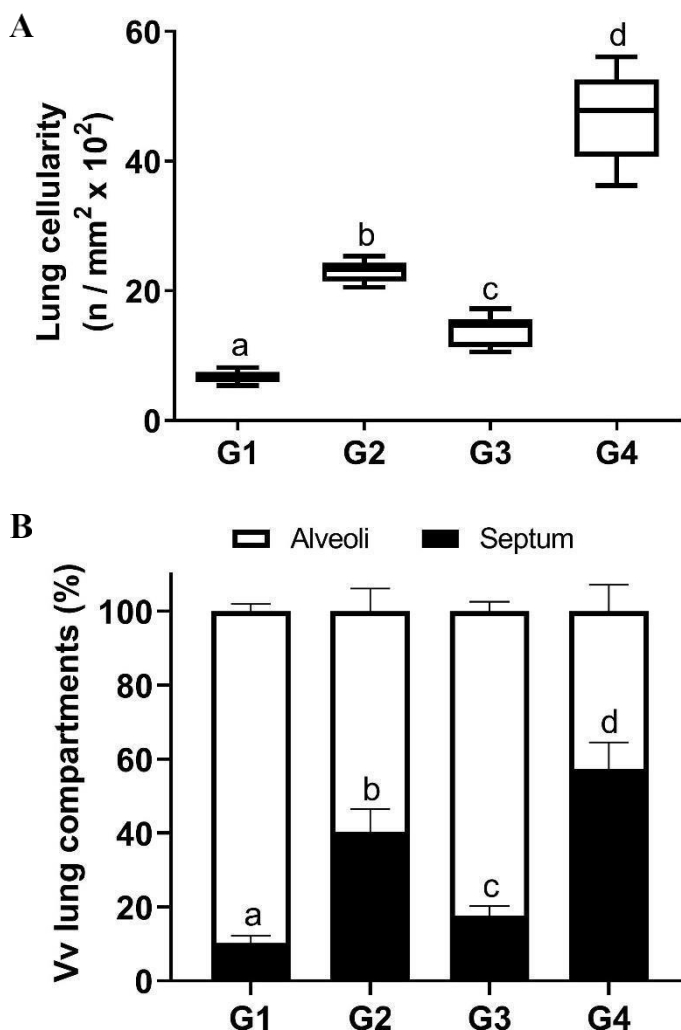
Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Controle não infectado: organização histológica normal com alvéolos bem definidos, septo alveolar delgado e baixa celularidade. (B) Infectado com a estirpe PA14 da *P.aeruginosa*: infiltrado inflamatório difuso, espessamento de septo e alvéolos colapsados. (C) Tratado com 5-Fu e não infectado: aumento da celularidade pulmonar, discreto espessamento septal e estreitamento da luz alveolar. (D) Infectado com a estirpe PA14 e tratado com 5-Fu: Infiltrado inflamatório difuso, septos espessados, colapso alveolar, congestão vascular, infiltrado inflamarório alveolar. (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina) Barras (40 µm). Fotomicrografia de um corte histológico do pulmão de um animal representativo do gupo 1,2,3 e 4 (N=5 animais por grupo)

☆ = Alvéolo, ↗ = Septo alveolar

G1 – PBS/Não infectado G2 –PBS/Infectado G3 –5-Fu/Não infectado G4 –5-Fu/Infectado

Figura 8- Animais MIQ apresentam maior celularidade, espaço alveolar reduzido e septo mais largo quando comparados a animais não tratados (NT).



Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Gráfico da celularidade pulmonar (B) Gráfico da densidade e volume de septo alveolar. a,b,c,d Diferentes letras nos grupos indica diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). .N=5 animais por grupo

G1 – PBS/Não infectado G2 –PBS/Infectado G3 –5-Fu/Não infectado G4 –5-Fu/Infectado

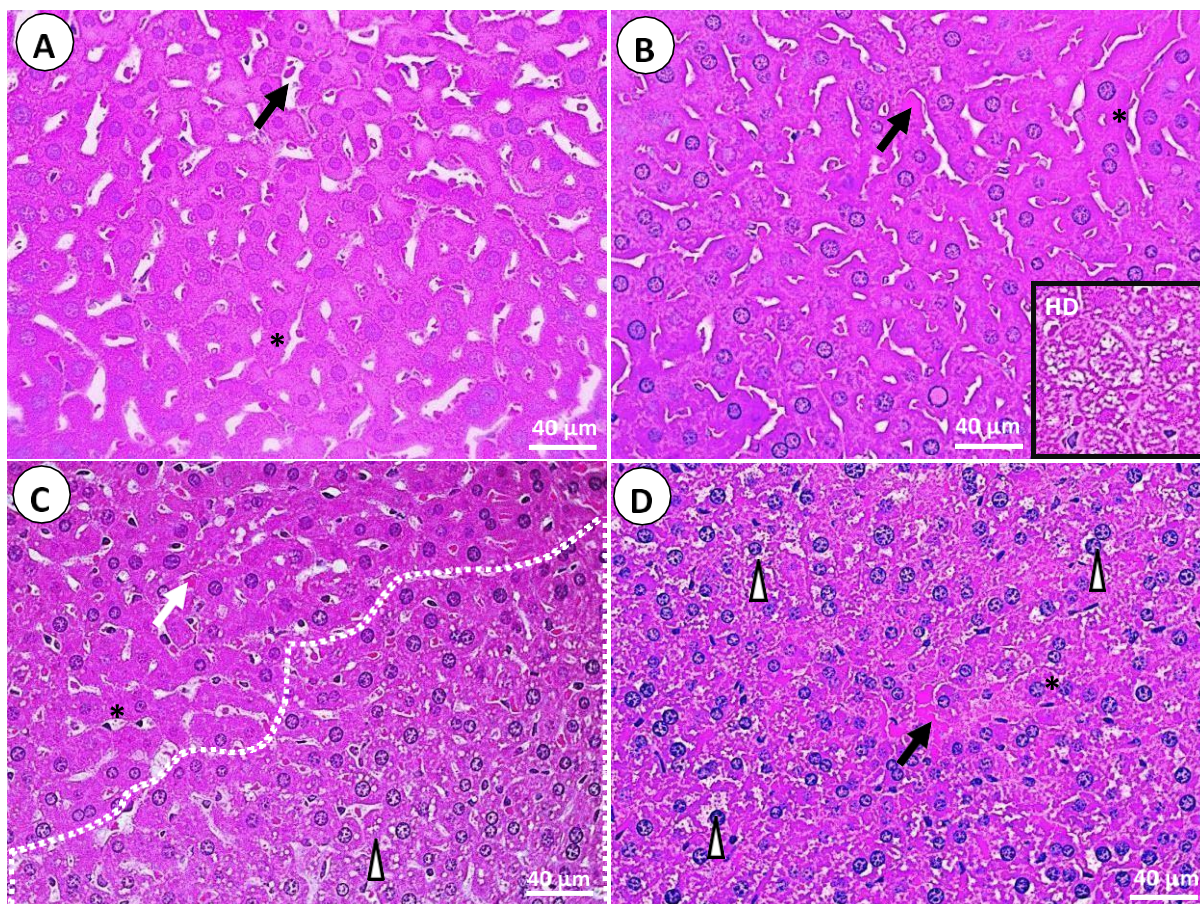
Os animais do grupo PBS/não infectado apresentaram microestrutura hepática normal, com baixa celularidade intersticial, cordões de hepatócitos e capilares sinusoidais evidentes. No grupo PBS/infectado, observou-se estreitamento do leito capilar, e focos bem delimitados de degeneração hidrópica em hepatócitos. No grupo 5-Fu/não infectado, estreitamento do leito capilar, aumento da celularidade tecidual, hipotrofia de hepatócitos e áreas extensas de hepatócitos com degeneração hidrópica foram identificadas. Os animais do grupo 5-Fu/infectados apresentaram aumento da celularidade intersticial, hipotrofia de hepatócitos, marcante colapso de capilares sinusoidais, e distribuição generalizada de hepatócitos com degeneração hidrópica (Figura 9).

Estes resultados corroboram com os resultados observados na contagem de UFC, demonstrando que em 10 horas de infecção, a estirpe PA14 de *P. aeruginosa* foi capaz de se disseminar e causar danos no fígado além de que a hepatotoxicidade do fármaco contribuiu para alteração de maior intensidade em 5-Fu/infestado quando comparado a 5-Fu/não infestado.

Ao comparar os grupos tratados com 5-Fu/não infestados em comparação com os que não receberam o tampão salino-fosfato e não foram infestados, foi possível observar a toxicidade hepática na metabolização do 5-Fu de maneira isolada, sem presença bacteriana, descrita pelo aumento da celularidade e degeneração hidrópica quando comparado ao grupo controle (A).

Corroborando os achados histopatológicos, os achados estereológicos hepáticos (Figura 10) indicaram que comparados ao grupo PBS/não infestado, todos os grupos apresentaram diferença significativa recíproca na celularidade intersticial e na proporção de hepatócitos em degeneração, que foi maior em 5-Fu/infestado, seguido por 5-Fu/não infestados e PBS/infestado ($P < 0,05$). A densidade de número de hepatócitos foi maior nos grupos 5-Fu/infestado comparado ao grupo 5-Fu/não infestados ($P < 0,05$), os quais exibiram maior distribuição de hepatócitos em relação dos grupos PBS/não infestado e PBS/infestado ($P < 0,05$), que demonstraram resultado similar ($P > 0,05$). Todos os grupos apresentaram menor proporção de capilares sinusoidais em relação ao grupo PBS/não infestado ($P < 0,05$). Esse parâmetro foi menor no grupo 5-Fu/infestado comparado aos grupos PBS/infestado e 5-Fu/não infestados ($P < 0,05$), que demonstraram resultado similar ($P > 0,05$).

Figura 9- Análise histopatológica do fígado de camundongos PBS/Não infectados, PBS/Infectados, 5-FuNão infectados, 5-Fu/Infectados analisados 10 horas após a infecção com a estirpe PA14 da *P. aeruginosa*.



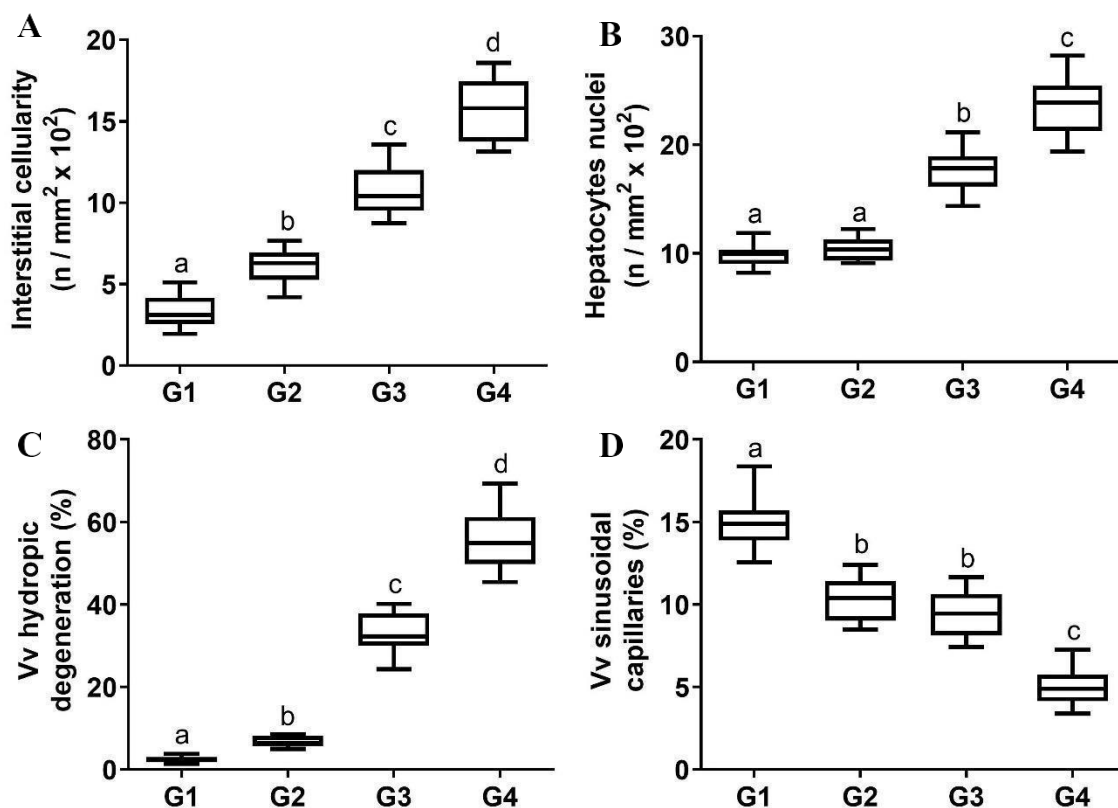
Fonte: Do autor.

Legenda: (A) Controle não infectado: organização histológica normal com hepatócitos bem definidos. (B) Infectado com a estirpe PA14: degeneração hidrópica. (C) Tratado com 5-Fu e não infectado: congestão vascular de baixa intensidade, degeneração hidrópica localizada sendo demarcada pela linha pontilhada. (D) Infectado com a estirpe PA14 e tratado com 5-Fu: degeneração hidrópica difusa, congestão vascular de maior intensidade. (Microscopia de campo claro, coloração: hematoxilina-eosina) Barras (40 μ m). Fotomicrografia de um corte histológico do fígado de um animal representativo do gupo 1,2,3 e 4 (N=5 animais por grupo).

↗ = Presença/Ausência de congestão vascular, * = Hepatócito sem evidência de degeneração, \blacktriangle = Área de degeneração hidrópica.

G1 – PBS/Não infectado G2 –PBS/Infectado G3 –5-Fu/Não infectado G4 –5-Fu/Infectado

Figura 10- Animais MIQ apresentam menor densidade de capilares sinusóides hepáticos, maior celularidade intersticial, degeneração hidrópica e núcleo de hepatócitos quando comparados a animais não tratados (NT).



Fonte: Do autor.

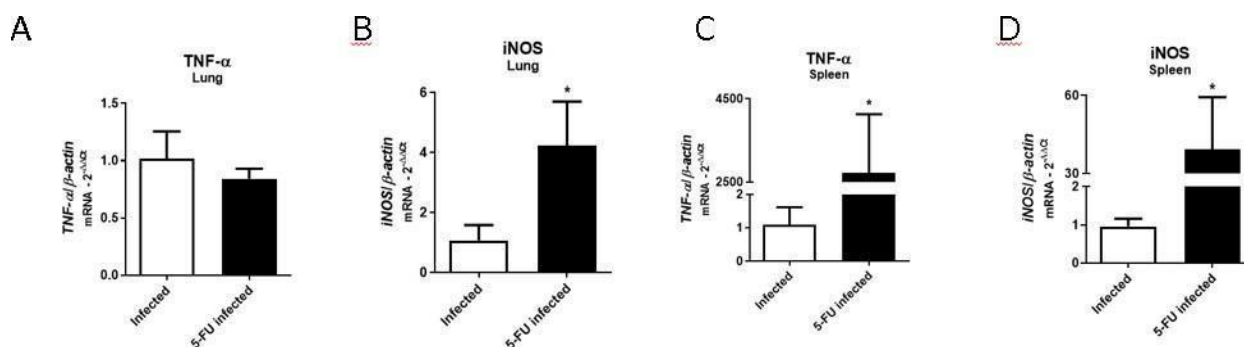
Legenda: (A) Gráfico da celularidade intersticial (B) Gráfico da quantidade de núcleo em hepatócitos (C) Gráfico da densidade e volume da degeneração hidrópica (D) Gráfico da densidade e volume de capilares sinusóides. a,b,c,d Diferentes letras nos grupos indica diferença estatística entre os grupos (P<0,05). .N=5 animais por grupo G1 – PBS/Não infectado G2 –PBS/Infectado G3 –5-Fu/Não infectado G4 –5-Fu/Infectado

6.6 Animais sob condições de mucosite induzida pelo 5-Fu apresentam maior expressão de *iNOS* e *TNF- α* quando infectados pela *P. aeruginosa* nos órgãos colonizados pela bactéria

Uma vez que há uma maior recuperação de bactérias nos órgãos dos animais sob condições de mucosite induzida pelo 5-Fu, assim como maiores danos teciduais, foi avaliada a expressão dos genes codificados de *iNOS* e *TNF- α* . Na análise da expressão diferencial de *TNF- α* foi observado um aumento da expressão do gene codificador dessa citocina no baço de camundongos sob condições de mucosite e infectados em relação aos camundongos que receberam PBS e foram infectados (Figura 11C). Já no pulmão não houve alteração da expressão desse gene (Figura 11A).

Na análise da expressão diferencial do *iNOS*, foi demonstrado um aumento da expressão desse gene no macerado de pulmão e baço de camundongos sob condições de mucosite e infectados em relação aos camundongos que receberam PBS e foram infectados (Figura 11B e D). Resultado representativo de aumento na expressão do gene para possível produção de óxido nítrico na tentativa de eliminação da *P. aeruginosa* depurada nos tecidos.

Figura 11- Animais sob condições de mucosite induzida pelo 5-Fu e infectados pela *P. aeruginosa* apresentam maior expressão diferencial dos genes *iNOS* no baço e pulmão quando comparados aos animais controles.



Fonte: Do autor

Nota: A expressão diferencial do gene *TNF- α* foi maior no baço de animais 5-Fu/infectados em comparação a PBS/infectados, porém sem diferença significativa no pulmão. A análise da expressão dos genes marcadores pró-inflamatórios *iNOS* e *TNF- α* no macerado de pulmão e baço de animais 5-Fu/infectados e PBS/infectados com a estirpe PA14 de *P. aeruginosa* foi realizada por RT-qPCR. Análise da expressão diferencial de *TNF- α* (A e C), *iNOS* (B e D) de animais 5-Fu ou PBS quando infectados pela estirpe virulenta de *P. aeruginosa*. Os resultados estão expressos a partir da análise relativa da quantidade de mRNA pela equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ em relação ao grupo Infectado (calibrador). * $p < 0,05$ em relação ao grupo PBS/infectado. N=5 animais/grupo. O resultado apresentado é representativo de três experimentos independentes.

G1 – PBS/Não infectado G2 – PBS/Infectado G3 – 5-Fu/Não infectado G4 – 5-Fu/Infectado

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que em modelo de mucosite induzida pelo quimioterápico 5-Fu, o hospedeiro murino fica mais suscetível à infecção pulmonar pela bactéria oportunista *P.aeruginosa*, apresentando pior quadro histopatológico e resposta compensatória exacerbada porém ineficaz na erradicação do patógeno.

Grande parte dos tratamentos quimioterápicos são capazes de causar de maneira aguda ou tardia efeitos colaterais prejudiciais à saúde do paciente sob tratamento. Um exemplo da ação prejudicial dos quimioterápicos nesses pacientes é a mucosite gastrointestinal, caracterizada por inflamação grave das mucosas do trato gastrointestinal, que leva à perda de peso (ESCOTT-STUMP, SYLVIA. MAHAN, 2010).

Neste trabalho, foi possível mimetizar o processo de mucosite gastrointestinal induzida pelo quimioterápico 5-Fu em modelo murino. Foi observado que a mucosite acarretou em perda de peso dos animais no decorrer de três dias consecutivos do tratamento (Figura 1) além de alteração na consistência fecal (Figura 2).

O 5-Fu é de grande utilização na prática clínica porém ulcerações epiteliais na mucosa e manifestações clínicas, como dor e sintomas dispépticos seguida por diarreia são sintomas que ocorrem em 80% dos pacientes sob tratamento (GRASSOTTI *et al.*, 2018; WEICHSELBAUM; KLEIN, 2018). As primeiras evidências neste estudo demonstrando a nocividade da utilização do quimioterápico 5-Fu em modelo murino é manifestada pela perda de peso contínua tempo/dependente, sem alteração da dose farmacológica durante o período de três dias consecutivos (Figura 1).

Os estudos de Leocádio e colaboradores (2015), Li e colaboradores (2017), Zhang e colaboradores (2018), demonstraram que o peso corpóreo de animais frente a doses de 5-Fu (25mg/kg, 50mg/kg, 100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg) são capazes de levar a diarreia severa entre os animais, índice elevado de perda de peso, e acima de 100mg/kg a sintomatologia era seguida de morte pelos animais no protocolo de Zhang. Toda essa sintomatologia é decorrente da toxicidade gerada pelo fármaco às células intestinais, demonstrada histologicamente por hipoplasia das criptas, redução da espessura da mucosa e presença de células inflamatórias, sendo descrita na literatura como originada a partir da ativação de via extrínseca da apoptose via caspases 3 e 8 e ativação de receptores de morte como *TNF- α* (NAHLA HAMOUDA *et al.*, 2017).

É muito comum observar que em estudos que fazem análise de aspectos digestórios ocorra a mensuração do escore fecal em animais como um indicador de digestibilidade. Neste

experimento, a alteração da consistência fecal e aspecto úmido indica a baixa digestibilidade ao longo do TGI (Figura 2). Heinzmann e colaboradores (2015) afirmam que em murinos a maior parte das alterações metabólicas ocorrem no ceco, onde o microbioma produz metabólitos microbianos. Além disso, o ceco é responsável pela consistência do bolo fecal e absorção de água e eletrólitos. Já Abdul e colaboradores (2019) alegam que a partir da degradação de nutrientes ocorre a liberação de metabólitos que ativam mecanismos de cascata sistêmicos no hospedeiro, tanto para os aspectos metabólicos quanto para a modulação do sistema imune. Com uma perda excessiva de nutrientes decorrentes de má absorção, isso impactará no peso corpóreo, podendo também ser observado alterações na consistência fecal conforme intensidade do sintoma desabsortivo (ESCOTT-STUMP, SYLVIA. MAHAN, 2010).

A imunidade inata intestinal é mediada tanto por fatores físicos quanto químicos, especificamente por células epiteliais especializadas que realizam secreção de fatores protetores como mucinas e defensinas além da presença de células residentes como células dendríticas e macrófagos. Apesar desse sofisticado mecanismo de proteção da integridade intestinal presentes na mucosa frente a toxinas e fatores ambientais, isso não foi suficiente para garantir a proteção seguida de regeneração da mesma para reversão do quadro desabsortivo dos animais com consequente perda de peso causado pelos danos provenientes do uso do 5-Fu (DENNING *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017; STRINGER *et al.*, 2009).

A microbiota intestinal, representada pela população de microrganismos presentes no trato digestório, apresenta papel fundamental na função imunológica do hospedeiro. Sua simbiose a partir de vírus, fungos, bactérias e o hospedeiro é de suma importância para o estado saúde/doença do indivíduo. Dependendo de fatores ambientais e/ou patológicos como estado alimentar, hospitalização, o tratamento farmacológico ocasiona em alterações dessa microbiota em uma condição denominada de disbiose (BELKAID; HAND, 2014; HONDA; LITTMAN, 2016; JANDHYALA *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2018).

Neste estudo, foi demonstrado a partir da análise por PCR quantitativo para os grupos bacterianos fecais que a administração do fármaco 5-Fu foi capaz de gerar disbiose intestinal levando a um aumento na quantidade de *Gammaproteobacterias* e redução de *Bacteroidetes/Firmicutes* (Figura 3). A modificação do microbioma bacteriano comensal está fortemente associada a uma maior susceptibilidade e gravidade sintomatológica da mucosite, sendo que nas fezes a quantidade de bactérias é representativa de todo microbioma do TGI, com sua maior concentração sendo proveniente do ceco (HONG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2017; STRINGER *et al.*, 2013).

As *Gammaproteobacterias*, sendo bactérias Gram-negativas apresentam lipopolissacarídeo (LPS) conhecido como endotoxina capaz de ativar um estado pró- inflamatório quando presentes. O intestino inflamado, seja por patógenos, por uma alimentação inadequada ou por agentes farmacológicos fornece um ambiente favorável para o crescimento de enterobactérias (ZENG; INOHARA; NUÑEZ, 2017).

Foi descrito por Lupp e colaboradores (2007) que a inflamação mediada pelo hospedeiro foi capaz de aumentar o número de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Frente ao aumento exacerbado de espécies dessa família, a detecção destes microrganismos e seus metabólitos são reconhecidos por células T e células dendríticas ocorrendo perda da tolerância pela microbiota comensal, o que desencadeia uma resposta imunológica ainda mais danosa ao epitélio em conjunto à citotoxicidade gerada pelo 5-Fu facilitando a translocação bacteriana (BELKAID; HAND, 2014). Esse resultado sugere que a mucosite induzida pelo 5-Fu também tem como mediador dessa inflamação a disbiose intestinal (RIGOTTIER-GOIS, 2013). A análise histopatológica histomorfométrica de ceco corrobora com esses dados, demonstrando aspecto ulceroso na região da mucosa, elevada concentração de células inflamatórias, linfócitos intraepiteliais significativamente aumentado, redução da espessura de mucosa e destruição da cripta de Lieberkühn. Os grupos 5-Fu apresentaram maiores danos intestinais em relação aos grupos PBS (Figura 4).

Firmicutes e *Bacteroidetes* estão entre os principais filos bacterianos presentes em murinos e humanos além de outros mamíferos, sendo caracterizadas por bactérias anaeróbias. Entre os filos de *Firmicutes* estão presentes as classes *Bacillus*, *Clostridium* e *Mollicutes* e dos *Bacteroidetes* os *Bacteroides*, *Flavobacteria* e *Sphingo-bacterias* (HUGENHOLTZ; DE VOS, 2018; MAHOWALD *et al.*, 2009). Tais gêneros são de suma importância para degradação de carboidratos complexos e produção de vitaminas (OTTMAN *et al.*, 2012). Neste estudo, foi observada diminuição desses gêneros no terceiro dia de tratamento por 5-Fu e um aumento de *Gammaproteobacterias*.

Para demonstrar a importância das bactérias comensais do intestino, foi demonstrado pelo estudo de Yeung e colaboradores (2015) que a utilização de probióticos via oral é capaz de atenuar a mucosite intestinal pela possível modulação da microbiota ali presente. Essa modulação seria capaz de impedir a colonização por microrganismos patogênicos, assim como amenizar a liberação de citocinas pró-inflamatórias impedindo que uma retroalimentação positiva de inflamação intestinal e mediadores químicos locais ocorra.

O estudo de Montassier e colaboradores (2015) demonstrou que a quimioterapia é capaz de reduzir a diversidade do microbioma intestinal sem a interferência de aspectos como idade, uso de antibióticos anteriormente ou sexo.

A disbiose intestinal é capaz de reduzir a eficácia do efeito antitumoral do 5-Fu, sendo demonstrado pelo estudo de Yuan e colaboradores (2018). A diminuição da eficácia do fármaco ao conter o crescimento tumoral é algo que pode levar à utilização de concentrações cada vez mais elevadas visando um efeito farmacológico adequado. Essa situação se torna extremamente prejudicial ao paciente sob tratamento, visto que doses elevadas são capazes de gerar maiores danos na mucosa e piora no quadro absortivo intestinal dos indivíduos sob tratamento, prejudicando seu prognóstico. O estudo de Zhang e colaboradores (2018) foi capaz de demonstrar em modelo murino que a piora sintomatológica está correlacionada diretamente à dose de 5-Fu utilizada.

O uso de probióticos também foi descrito por Abdel e colaboradores (2009) como sendo capaz de amenizar a diarreia de pacientes sob tratamento quimioterápico. A diarreia é um dos principais sintomas do tratamento com o 5-Fu devido ao surgimento da mucosite.

Infere-se que a utilização do quimioterápico é capaz de alterar morfológicamente a mucosa intestinal gerando pontos com infiltrados inflamatórios pela toxicidade celular, fato confirmado pelos autores Lo e colaboradores (2012), Soares e colaboradores (2013) em seus respectivos estudos. Dessa maneira podemos compreender o motivo pelo qual a análise histológica cecal dos grupos 5-Fu apresentam danos ulcerativos e inflamatórios. Os mamíferos, de modo geral, a partir da morte celular são capazes de liberar moléculas associadas aos danos celulares (DAMPs - *Damage-associated molecular patterns*) que são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões da imunidade inata (PRRs - *Pattern recognition receptors*). As células imunitárias intestinais como descrito em Abbas (2015) é capaz de promover liberação de citocinas tanto locais quando sistêmicas, além de quimiocinas, em que frente a esse processo, diversas células imunes se concentram no foco de injúria de maneira quimiotática. Assim, os danos causados pela toxicidade do quimioterápico podem ser o motivo pelo qual houve desencadeamento de uma resposta patológica percebida nas análises histológicas (Figuras 4,7 e 9)

Sabendo que a microbiota intestinal tem uma estreita relação com a resposta imune sistêmica do hospedeiro, dados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que alteração da microbiota intestinal causada por antibacterianos influencia na resposta imune pulmonar durante a infecção por bactérias oportunistas (ROSA *et al.* 2018). Neste trabalho foi observado a estreita relação entre a mucosite gastrointestinal, alterações no microbioma bacteriano intestinal e a resolução da infecção pela bactéria oportunista *P. aeruginosa*.

Observou-se no presente estudo que o uso prévio do quimioterápico 5-Fu resultou em maior suscetibilidade à infecção pulmonar pela bactéria estirpe virulenta PA14 *P. aeruginosa*. Essa suscetibilidade é observada por uma maior recuperação de bactérias viáveis no pulmão, baço e fígado de animais tratados quando comparados àqueles não tratados com o quimioterápico frente à infecção pela *P. aeruginosa* (Figura 6).

Posteriormente à indução de mucosite, os camundongos que foram submetidos a infecção intratraqueal pela bactéria *P. aeruginosa*, adquiriram um caráter inflamatório difuso por novo ponto inflamatório além do intestinal, com recrutamento maciço de fagócitos especialmente neutrófilos pelo mecanismo inato frente à injúria pulmonar na tentativa de erradicação desse patógeno (Figura 7,B e D).

A espécie *P. aeruginosa*, utiliza sinalização extracelular sendo capaz de invadir múltiplos tipos celulares epiteliais tanto *in vivo* quanto *in vitro* (GONÇALVES-DE- ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; KROKEN *et al.*, 2018). Berube (2015) descreve que diversos patógenos são capazes de escapar do processo de fagocitose no pulmão e atingir a corrente sanguínea. Durante a pneumonia em sua fase aguda, a *P. aeruginosa* é capaz de secretar uma toxina enzimática denominada ExoS com característica de GTPase impedindo atividade fagocítica. Outro tipo exotoxina é a de LasB, uma protease capaz de clivar a proteína de adesão VE-caderina, gerando a perda da integridade entre células, e consequente disseminação de focos bacterianos pela corrente sanguínea, também denominado de bacteremia. Neste trabalho, foi observado que os danos causados pela mucosite proveniente do uso do 5-Fu resultaram em uma maior quantidade da *P. aeruginosa* em outros tecidos como o fígado e o baço em comparação à quantidade recuperada em animais infectados, mas não tratados com o quimioterápico (Figura 6). É possível que essa maior translocação do pulmão para outros órgãos seja devido à toxicidade do 5-Fu observada nos pulmões de animais com mucosite em combinação da secreção de iNOS por células fagocíticas pulmonares, sendo facilitado também pelo processo de disbiose gerado a partir da quimioterapia e secreção de exoenzimas da estirpe PA14 da *P. aeruginosa* que a fornece caráter de invasão de outros tecidos podendo escapar da célula pulmonar adquirindo caráter sistêmico.

Além da injúria pulmonar observada nesse trabalho, foi verificado o aumento da expressão diferencial do gene codificador da citocina pró-inflamatória *TNF-alpha* nos tecidos dos animais sob condições de mucosite e infectados pela bactéria *P. aeruginosa*.

O reconhecimento da *P. aeruginosa* pelos receptores de células do sistema imune inato resulta na ativação das vias de sinalização de NF- κ B, um fator de ativação e regulação da expressão gênica, este leva a secreção de citocinas próinflamatórias como IL-6, IL-8 e TNF- α importantes na erradicação bacteriana. As respostas inflamatórias exacerbadas estão associadas

a uma grave destruição tecidual com o aumento da chance de mortalidade do hospedeiro, sendo também causador da doença mesmo na ausência do microrganismo patogênico (LIN; KAZMIERCZAK, 2017).

De acordo com os dados da histopatologia e histomorfometria pulmonar, observou-se espessamento dos septos além de congestão e colabamento dos alvéolos, além de elevada concentração de células inflamatórias. Nestas observações é possível estabelecer a relação do aumento da quantidade de bactérias viáveis no pulmão dos animais infectados realizando estimulação do sistema imune inato pulmonar na expressão dos genes *TNF- α* e *iNOS*.

A expressão gênica nem sempre prediz a presença de uma proteína, visto que vários processos intermediários ocorrem entre seu início e o produto final (transcrição e tradução). No presente estudo, a expressão do gene codificador de *TNF- α* se mostrou elevado em grupos infectados no pulmão e no baço. O que chama atenção é a expressão elevada do gene *TNF- α* no baço de animais MIQ exibindo diferença significativa em relação ao controle negativo (PBS/infectado).

Sendo *TNF- α* uma citocina de extrema importância nas respostas inflamatórias agudas, pode-se inferir que um provável processo inflamatório ocorreu com maior intensidade no baço de animais tratados com o quimioterápico, levando em consideração que a quantidade de bactérias viáveis naquele órgão era superior ao grupo PBS/infectado.

O baço é classificado como um órgão linfóide secundário, e dentre suas principais funções está a realização de resposta imunológica frente a antígenos presentes no sangue. Por se tratar de um órgão capaz de filtrar o sangue, este é altamente vascularizado, facilitando sua infecção via circulação sanguínea. Em sua estrutura são encontrados macrófagos e células dendríticas que estão presentes na zona marginal que são importantes secretores de *TNF- α* .

A análise da expressão diferencial do gene *iNOS* demonstrou uma maior expressão deste gene no pulmão e baço de animais 5-Fu/infectados em relação a PBS/infectados. Ao tratar desse gene, o seu produto final também denominado óxido nítrico(NO) é importante em auxiliar na perpetuação da inflamação, sendo também uma forma de eliminação da *P. aeruginosa* ao ser excretado por células imune como os macrófagos. Dentre suas funções, o NO aumenta o tônus vascular e fluxo sanguíneo para o local de injúria, onde dessa maneira os leucócitos conseguem se agrupar com facilidade. Dessa maneira, podemos inferir que houve maior estimulação gênica para produção desse agente oxidante em animais tratados com quimioterápico, levando em consideração que esses animais apresentavam uma debilidade maior pela quantidade de bactérias viáveis recuperadas a partir do pulmão e baço.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento sugerem que a administração do quimioterápico 5-Fu em modelo murino o torna mais suscetível à infecção pulmonar pela bactéria oportunista *P. aeruginosa*. Demonstramos que a estirpe PA14 foi capaz de se espalhar a partir da infecção pulmonar para órgãos como fígado e baço e a presença de mucosite tornou possível maior recuperação de bactérias viáveis em animais sob tratamento, onde a resposta inata a partir da expressão gênica de *TNF- α* e *iNOS* não se mostraram eficazes para conter a multiplicação bacteriana. Este trabalho dá suporte à possibilidade de investigação de novos trabalhos que visem melhor qualidade de vida para indivíduos que fazem uso do agente quimioterápico 5-Fu além de possibilidade de identificação de novos biomarcadores alvo para conter a severidade dos sintomas associados a mucosite gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular** – Abbas. 8. ed-2. Elsevier Editora Ltda, 2015.
- ABD EL-ATTI, S. *et al.* Use of probiotics in the management of chemotherapy-induced diarrhea: A case study. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 33, n. 5, p. 569–570, 2009.
- ABDUL RAHIM, M. B. H. *et al.* Diet-induced metabolic changes of the human gut microbiome: importance of short-chain fatty acids, methylamines and indoles. **Acta Diabetologica**, v. 4, n. 3, p. 23-27, 2019.
- ALIBERTI, S. *et al.* The role of neutropenia on outcomes of cancer patients with community-acquired pneumonia. **European Respiratory Journal**, v. 33, n. 1, p. 142–147, 2009.
- AMMANN, R. A. *et al.* Bloodstream infection in paediatric cancer centres—leukaemia and relapsed malignancies are independent risk factors. **European Journal of Pediatrics**, v. 174, n. 5, p. 675–686, 2015.
- HAGENKORT, A. **Exploiting Nucleotide Metabolism to Improve Cancer Therapy**. 2016. 71 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Médica e Biofísica). Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, 2016.
- AOUN, J. K. M. Opportunistic infections in patients with cancer. **Annals of Oncology**, v. 15, n. 4, p. 329–335, 2004.
- BAJAJ, S. K.; TOMBACH, B. Respiratory infections in immunocompromised patients: Lung findings using chest computed tomography. **Radiology of Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. 29–37, 2017.
- BANERJEE, P. *et al.* Unveiling the Self-Assembling Behavior of 5-Fluorouracil and its N,N'-Dimethyl Derivative: A Spectroscopic and Microscopic Approach. **Langmuir**, v. 33, n. 41, p. 10978–10988, 2017.
- BASSETTI, M. *et al.* How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs in Context**, v. 7, n.1, p. 1–18, 2018.
- BAYES, H. K. *et al.* T helper cell subsets specific for *Pseudomonas aeruginosa* in healthy individuals and patients with cystic fibrosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 29-63, 2014.
- BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 121–141, 2014.
- BERUBE, B. J.; RANGEL, S. M.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. **Current Genetics**, v.62, n.1, p. 109-113, 2015.
- BRODER, U. N.; JAEGER, T.; JENAL, U. LadS is a calcium-responsive kinase that induce acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature Microbiology**, v. 2, n.1, p. 1–11, 2016.
- CASALE, F. *et al.* Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 173–179, 2004.

- CERCEO, E. *et al.* Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 5, p. 412–431, 2016.
- CUPERTINO, MC. *et al.* Long-lasting morphofunctional remodelling of liver parenchyma and stroma after a single exposure to low and moderate doses of cadmium in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 5, p.343–351.
- CHOI, T. Y.; LEE, M. S.; ERNST, E. Moxibustion for the treatment of chemotherapy-induced leukopenia: a systematic review of randomized clinical trials. **Supportive Care in Cancer**, v. 23, n. 6, p. 1819–1826, 2015.
- DE BENTZMANN, S.; PLÉSIAT, P. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 1655–1665, 2011.
- DENNING, T. W. *et al.* Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. **Seminars in Perinatology**, v. 41, n. 1, p. 15–28, 2017.
- DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 2008.
- DO CARMO, F. L. R. *et al.* Whey Protein Isolate-Supplemented Beverage, Fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the Prevention of Mucositis in Mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. September, p. 1–18, 2018.
- DÖRR, W.; BRANKOVIC, K.; HARTMANN, B. Repopulation in mouse oral mucosa: Changes in the effect of dose fractionation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 76, n. 3, p. 383–390, 2000.
- DOS SANTOS, D.C. *et al.* Morphologic characterization and distribution of endocrine cells in the large intestine of the opossum *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826). **Tissue Cell**, v. 45, n.5, p. 338-349, 2013;
- DUBOIS, V. *et al.* Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12: Efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of β -lactam resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 2072–2078, 2001.
- ESCOTT-STUMP, SYLVIA.; MAHAN, K. **Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia-Krause**. 12. ed-2. Elsevier Editora Ltda, 2010.
- FABER, J. *et al.* Bacterial Translocation Is Reduced by a Specific Nutritional Combination in Mice with Chemotherapy-Induced Neutropenia. **The Journal of Nutrition**, n. 141, v. 7, p. 1292-1308, 2011.
- FILLER, R.; SAHA, R. Fluorine in medicinal chemistry: A century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights. **Future Medicinal Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 777–791, 2009.
- FOCACCETTI, C. *et al.* Effects of 5-fluorouracil on morphology, cell cycle, proliferation, apoptosis, autophagy and ros production in endothelial cells and cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–25, 2015
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159–173, 2013.

- GHIRINGHELLI, F.; APETOH, L. Enhancing the anticancer effects of 5-fluorouracil: Current challenges and future perspectives. **Biomedical Journal**, v. 38, n. 2, p. 111–116, 2015.
- GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F. *et al.* Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lung disease. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n. 1, p. 20–28, 2016.
- GONÇALVES, RV *et al.* Hepatoprotective effect of *Bathysa cuspidata* in a murine model of severe toxic liver injury. **Int J Exp Pathol**. 2012;93(5):370-6.
- GRASSOTTI, T. T. *et al.* Antimicrobial Resistance Profiles in *Enterococcus spp.* Isolates From Fecal Samples of Wild and Captive Black Capuchin Monkeys (*Sapajus nigritus*) in South Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. October, p. 1–10, 2018.
- HAUNER, K.; MAISCH, P.; RETZ, M. Nebenwirkungen der Chemotherapie. **Urologe**, v. 56, n. 4, p. 472–479, 2017.
- HEINZMANN, S. S.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Deep metabotyping of the murine gastrointestinal tract for the visualization of digestion and microbial metabolism. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 5, p. 2267–2277, 2015.
- HONDA, K.; LITTMAN, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 75–84, 2016.
- HONG, B. Y. *et al.* Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 1–18, 2019.
- HUGENHOLTZ, F.; DE VOS, W. M. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 1, p. 149–160, 2018.
- JANDHYALA, S. M. *et al.* Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 29, p. 8836–8847, 2015.
- JOSÉ, R. J.; BROWN, J. S. Opportunistic bacterial, viral and fungal infections of the lung. **Medicine**, v. 44, n. 6, p. 378–383, 2016.
- KAKLAMANI, V. G.; GRADISHAR, W. J. Role of capecitabine (Xeloda®) in breast cancer. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 3, n. 2, p. 137–144, 2003.
- KILKENNY, C. *et al.* Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, p. 1-5, 2010.
- KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medicine et Maladies Infectieuses**, v. 36, n. 2, p. 78–91, 2006.
- KROKEN, A. R. *et al.* The impact of ExoS on *Pseudomonas aeruginosa* internalization by epithelial cells is independent of fleQ and correlates with bistability of type three secretion system gene expression. **mBio**, v. 9, n. 3, p. 1–21, 2018.

- LAVOIE, E. G.; WANGDI, T.; KAZMIERCZAK, B. I. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 14–15, p. 1133–1145, 2011.
- LI, H. L. *et al.* Alteration of gut microbiota and inflammatory cytokine/chemokine profiles in 5-fluorouracil induced intestinal mucositis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- LO, H.Y. *et al.* 5-Fluorouracil Induced Intestinal Mucositis via Nuclear Factor- κ B Activation by Transcriptomic Analysis and In Vivo Bioluminescence Imaging. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–8, 2012.
- LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 330–338, 2003.
- LUPP, C. *et al.* Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host and Microbe**, v. 2, n. 2, p. 119–129, 2007.
- MANDARIM-DE-LACERDA C, A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n.3, p. 469-486, 2003.
- MAHOWALD, M. A. *et al.* Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5859–5864, 2009.
- MENEZES-GARCIA, Z. *et al.* Mechanisms Underlying Chemotherapy-Associated Mucositis: The Role of Inflammatory Mediators and Potential Therapeutic Targets. **European Medical Journal**, v. 6, n. 1, p. 82–91, 2018.
- MIKKELSEN, H.; MCMULLAN, R.; FILLOUX, A. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p.1-9, 2011.
- MIURA, K. *et al.* 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. **Cancers**, v. 2, n. 3, p. 1717–1730, 2010.
- MONTASSIER, E. *et al.* Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, n. 5, p. 515–528, 2015.
- MOUGEOT, J. C. *et al.* **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 3, n. 4, p. 12-27, 2019.
- NAHLA HAMOUDA, *et al.* Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-induced Intestinal Mucositis in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 121, n. 3, p. 159–168, 2017.
- NOVAES, RD *et al.* Bark extract of *Bathysa cuspidata* attenuates extra-pulmonary acute lung injury induced by paraquat and reduces mortality in rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 93, n. 3, p.225-233, 2012.

- NOVAES, RD *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. **Parasitol Research**, v. 114, n. 8, 2015, p. 2873-81, 2015.
- OTTMAN, N. *et al.* The function of our microbiota: who is out there and what do they do? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. 2, p. 104-112, 2012.
- PÉREZ DE CASTRO, I.; DE CÁRCER, G.; MALUMBRES, M. A census of mitotic cancer genes: New insights into tumor cell biology and cancer therapy. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 5, p. 899–912, 2007.
- PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 1–21, 2018.
- RAFEEQ, M. M.; MURAD, H. A. S. Cystic fibrosis: Current therapeutic targets and future approaches. **Journal of Translational Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2017.
- RAMANA, G. V. *et al.* Chemotherapy-Induced and/or Radiation Therapy-Induced Oral Mucositis-Complicating the Treatment of Cancer. **Neoplasia**, v. 6, n. 5, p. 423–431, 2006.
- RIBEIRO, R. A. *et al.* Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 881–893, 2016.
- RIGOTTIER-GOIS, L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: The oxygen hypothesis. **ISME Journal**, v. 7, n. 7, p. 1256–1261, 2013.
- ROCHA PEREIRA, AE *et al.* Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 178, n. 1, p. 21-29, 2017.
- RODRÍGUEZ-CABALLERO, A. *et al.* Cancer treatment-induced oral mucositis: A critical review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 2, p. 225–238, 2012.
- ROSA, C. P. *et al.* Antibiotic-induced dysbiosis effects on the murine gastrointestinal tract and their systemic repercussions. **Life Sciences**, v. 207, n. 1, p. 480–491, 2018.
- NILE, R.S.; HASSAN, L. A.; H. JABBER, E.Y. Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Wound and Burn Infections. **International Journal of Corrent Research in Biosciences and Plant Biology**, v. 2, n. 6, p. 153–162, 2015.
- SANGILD, P. T. *et al.* Animal models of chemotherapy-induced mucositis: Translational relevance and challenges. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 314, n. 2, p. 231–246, 2018.
- SEQUETTO, P.L. *et al.* The flavonoid chrysin attenuates colorectal pathological remodeling reducing the number and severity of pre-neoplastic lesions in rats exposed to the carcinogen 1,2-dimethylhydrazine. **Cell Tissue Research**, v. 352, n. 2, p. 327-39, 2013.

SOARES, P. M. G. *et al.* Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 46–49, 2013.

SONIS, S. T. *et al.* An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 69, n. 4, p. 437–443, 1990.

STRINGER, A. M. *et al.* Gastrointestinal microflora and mucins may play a critical role in the development of 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 4, p. 430–441, 2009.

STRINGER, A. M. *et al.* Biomarkers of chemotherapy-induced diarrhoea: A clinical study of intestinal microbiome alterations, inflammation and circulating matrix metalloproteinases. **Supportive Care in Cancer**, v. 21, n. 7, p. 1843–1852, 2013.

TANA, F.L. **Avaliação da expressão e do papel dos microRNAs mmu- miR- 155-5p e mmu-miR-146b-5p durante a infecção pulmonar causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa***. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.

VAN SEBILLE, Y. Z. A. *et al.* Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 11, 2015.

VIEIRA, W.D.A.; NAGATO, A.C.; CAMPOS, M.I.C. Experimental model of oral and intestinal mucositis in wistar rats. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 10, n. 1, p. 01–60, 2018.

WARDILL, H. R. *et al.* Animal models of mucositis: critical tools for advancing pathobiological understanding and identifying therapeutic targets. **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 13, n. 2, p. 119–133, 2019.

WEICHSELBAUM, L.; KLEIN, O. D. The intestinal epithelial response to damage. **Science China Life Sciences**, v. 61, n. 10, p. 1205–1211, 2018.

WILLIAMS, K. P. *et al.* Phylogeny of gammaproteobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2305–2314, 2010.

YEUNG, C. Y. *et al.* Amelioration of chemotherapy-induced intestinal mucositis by orally administered probiotics in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–16, 2015.

YOTSUMOTO, K. *et al.* 5-Fluorouracil treatment alters the expression of intestinal transporters in rats. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 38, n. 9, p. 509–516, 2017.

YUAN, L. *et al.* The influence of gut microbiota dysbiosis to the efficacy of 5-Fluorouracil treatment on colorectal cancer. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. 2, p. 184–193, 2018.

ZENG, M. Y.; INOHARA, N.; NUÑEZ, G. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 18–26, 2017.

ZHANG, S. *et al.* Assessment of dose-response relationship of 5-fluorouracil to murine intestinal injury. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. 1095, p. 910–919,

ANEXOS- Certificado da Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UNIFAL).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da resposta imune pulmonar murina contra a bactéria oportunista *Pseudomonas aeruginosa* em modelo de mucosite gastrointestinal induzido por quimioterápico", registrada com o nº 08/2019, sob a responsabilidade de Leonardo Augusto de Almeida, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 15/04/2019 a 28/02/2021
Espécie/linhagem/raça	BALB/c / isogênico
Nº de animais	24
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFMG

Alfenas, 15 de Abril de 2019.

Prof. Dr. Sandro Amadeu Cerveria
 Reitor da UNIFAL-MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled “Evaluation of the murine immune response against the opportunistic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* in a gastrointestinal mucositis model induced by chemotherapy”, registration number 08/2019, under the responsibility of Leonardo Augusto de Almeida, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching), is in compliance with Law no. 11794, published on October 8th, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15th, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas).

Purpose: () Teaching	(X) Scientific research
Expiration date	02/28/2021
Species/strain/breed	BALB/c mice / Inbred
Number of animals	24
Sex	Female
Origin	Central Vivarium UFMG

Alfenas, April 15, 2019.

Sandro Amadeu Cerveira
 Rector

