

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Gislaine Greice de Oliveira Silva

Padronização de Modelo “*in vivo*” de Tumor Ascítico de Ehrlich
Associado à Infecção Sistêmica

Orientadora: Prof. Dra. Susana Elisa Moreno
Co-orientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Junho- 2017

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Padronização de Modelo “*in vivo*” de Tumor Ascítico de Ehrlich
Associado à Infecção Sistêmica

Autora: Gislaine Greice de Oliveira Silva
Orientadora: Prof. Dra. Susana Elisa Moreno
Co-orientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde."

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Junho-2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

S586p Silva, Gislaine Greice de Oliveira
Padronização de modelo “in vivo” de tumor ascítico de Ehrlich
associado à infecção sistêmica / Gislaine Greice de Oliveira Silva;
orientadora Susana Elisa Moreno; coorientador Octávio Luiz Franco --
2017

65 f.+ anexos

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande, 2017.

Inclui bibliografias.

1. Câncer 2. Tumor de Ehrlich 3. *Escherichia coli* 4. Biotecnologia
1. Moreno, Susana Elisa 2. Franco, Octávio Luiz III. Título.

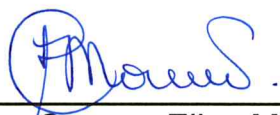
CDD: 616.994

Padronização de Modelo de Tumor Ascítico de Ehrlich Associado a Infecção Sistêmica em Camundongos

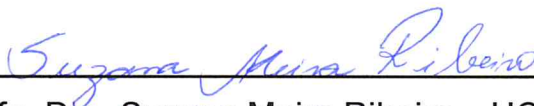
Autora: Gislaine Greice de Oliveira Silva
Orientadora: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno
Coorientador: Prof. Dr. Octavio Luiz Franco

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA em 09 de junho de 2017.



Profa. Dra. Susana Elisa Moreno – UCDB
(orientador)



Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro – UCDB



Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos – UFMS



Prof. Dr. Osmar Nascimento da Silva – UCDB

"Um homem sem amigos é uma terra sem umidade, uma manhã sem orvalho, um céu sem nuvens. Os amigos não são os que nos bajulam, mas os que desmistificam nosso heroísmo e revelam nossa fragilidade. Um intelectual sem amigos é um livro sem conteúdo".

Augusto Cury

*Dedico ao meu esposo Edilson pelo incentivo, apoio e
carinho e a meu filho Lucas por ser a razão do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

Aquele que é Digno de receber toda honra e glória. Ao meu Papai e meu Amado, Deus. Nada seria possível sem Tuas mãos me cobrindo de amor e graça, a Ti dedico toda a minha vida e todas as minhas conquistas.

Ao meu esposo Edilson Soares da Silveira, que foi meu companheiro em todas as etapas da minha formação, que se prontificou a me ajudar de todas as formas possíveis, que cumpriu o seu papel de esposo, cuidando, amando, ouvindo e aconselhando, espero que esta seja apenas mais uma conquista de muitas ao seu lado. Amo-te, meu amor.

Ao meu filho Lucas de Oliveira Silveira, por ser paciente com a minha ausência, por me amar e dar um novo sentido a minha vida. Todas as minhas conquistas são pra ti, e as dedico a ti. Meu príncipe, meu tudo, minha vida, te amo.

Aos meus filhos do coração, Marielle, Natália e Eduardo, obrigada por me deixar fazer parte da vida de vocês, amo vocês como se fossem meus.

A minha mãe Osdith, que sempre me incentivou. Exemplo de mulher batalhadora e guerreira, em ti eu me espelho. Obrigada mãe por estar sempre a disposição, por ser exemplo de bondade, honestidade, simplicidade e principalmente exemplo de devoção ao Nosso Papai do Céu.

Aos meus irmãos, Gilberto Luciano e Giselle Diniz que sempre estiveram ao meu lado, me incentivaram a correr atrás dos meus objetivos. Eu amo muito vocês e tenho certeza que o amor é recíproco. Obrigada por tudo.

Sogra e Sogra, obrigada pelo carinho, por me aceitarem do jeito que sou, e por me darem a oportunidade de estar ao lado do seu bem mais precioso.

Aos amigos, tios, tias, primos e primas, cunhados, cunhadas, sobrinhos que estão sempre torcendo pelas minhas conquistas. De longe ou de perto, todos fazem parte da minha história e serei eternamente grata.

A Prof. Dra. Susana Elisa Moreno, que me orientou em todos os aspectos sejam eles profissionais ou pessoais. Colocou-se como acolhedora e estimuladora e acima de tudo demonstrou confiança em meu trabalho. Mais que uma orientadora, uma ouvinte, uma amiga, uma mãe, um exemplo. Minha gratidão é imensurável, espero ser ao menos uma gota desse oceano de sabedoria.

Ao Prof. Dr. Octavio Luiz Franco, muitíssimo obrigado, por me ouvir, por me ajudar, por me incluir, por está sempre a disposição, exemplo de dedicação e profissionalismo a ser seguido.

A equipe maravilhosa dos laboratórios de Farmacologia e Inflamação e *S-inova Biotech* que me auxiliaram, incentivaram e sempre estiveram ao meu lado, me dando todo apoio e carinho. Principalmente agradeço a você Dani, por sempre me ajudar e estar ao meu lado nos momentos em que precisei. Vocês fazem parte da minha história e sou grata a isso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, por proporcionar um ambiente de comunhão, possibilitado novas amizades, sejam elas nacionais ou internacionais. Em especial a equipe da coordenação e secretaria, Dr. Cristiano, Silvia e Daiane que sempre se mostraram dispostos a sanar a minhas dúvidas, se prontificaram a me ajudar quando precisei.

Às empresas de fomento: Capes/PROSUP e CNPq, que tornou possível e plausível este mestrado. Sem o auxilio fornecido, não teria sido possível ter executado essa pesquisa e ter finalizado o mestrado, meu sincero obrigado.

Agradeço especialmente a você “minha flor” Bruna, minha amiga desde o início da graduação. Conselheira, irmã, parceira sempre pronta a me ajudar independente da hora, do dia ou do lugar. Obrigado por tudo, você me colocou pra cima nos momentos mais difíceis da minha vida. E sempre me aconselhou a seguir em frente e enfrentar os meus medos e os obstáculos. Te amo linda. Nós somos tão parecidas, mas ao mesmo tempo tão diferentes. Iguais a nós duas, só nós duas mesmo. Você é muito especial pra mim!

Aos animais experimentais, deixo meu pesar e meu respeito.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Nascida em Taiobeiras – MG no ano de 1990, Gislaine Greice de Oliveira Silva concluiu o ensino médio no ano de 2007. Ingressou na faculdade de Ciências Biológicas na Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) em 2011, onde concluiu a mesma no ano de 2014. Atualmente mestranda em biotecnologia também pela Universidade Católica Dom Bosco. Possui experiência na área de microbiologia, farmacologia e mutagenese, onde atua, principalmente, em experimentações animais com ênfase em infecção bacteriana, carcinogênese, avaliação anti-inflamatória, cicatrização e analgesia, bem como na avaliação de novos compostos bioativos e peptídeos em modelos animais.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	xii
TABELAS DO APÊNDICE.....	xiv
FIGURAS DO APÊNDICE.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer.....	1
1.1.1 Imunologia do câncer.....	4
1.1.2 Tratamento do câncer.....	6
1.1.3 Modelos experimentais para estudo do câncer.....	8
1.2 Infecções bacterianas.....	9
1.2.1 Modelos de infecções bacterianas.....	12
1.2.2 Infecção causada por <i>E. coli</i>	13
1.3 Infecções bacterianas em pacientes com câncer.....	16
1.3.1 Modelos de tumor e infecção.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos.....	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 Animais experimentais.....	23
4.2 Protocolo experimental.....	23
4.3 Manutenção das células tumorais de Ehrlich.....	24
4.4 Cinética de crescimento tumoral.....	24
4.5 Diferenciação celular do lavado peritoneal.....	25
4.6 Modelo de infecção sistêmica induzida por <i>E. coli</i>	25
4.7 Modelo de tumor ascítico de Ehrlich associado á infecção sistêmica por <i>E.coli</i>	26

4.7.1 Curva de sobrevivência.....	26
4.7.2 Quantificação bacteriana no sangue, pulmão e lavado peritoneal.....	27
4.7.3 Determinação do infiltrado de neutrófilos nos pulmões através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	27
4.7.4 Permeabilidade vascular.....	28
4.8 Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	30
5.1 Cinética de desenvolvimento do TAE em camundongos Balb-C.....	30
5.2 Caracterização da infecção por <i>E. coli</i> em camundongos Balb-C.....	35
5.3 Caracterização do modelo de TAE e <i>E. coli</i> em camundongos Balb-C.....	36
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÕES.....	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
APÊNDICES.....	66
APÊNDICE A	67
APÊNDICE B.....	68
APÊNDICE C.....	70
APÊNDICE D.....	71

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura1. Traços característicos na formação do tumor. Fonte: (HANAHAN; WEINBERG, 2011) Adaptada.....	2
Figura 2. Fases da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão tumoral. Fonte: (LIU et al., 2015) Adaptada.....	3
.	
Figura 3. Células presentes na origem do tumor. Fonte: (HANAHAN; WEINBERG, 2011) Adaptado.....	5
Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura colorizada de uma colônia de <i>Escherichia coli</i> . Fonte: (https://phil.cdc.gov/phil/details.asp) ID: 18160 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Public Health Image Library (PHIL), 2002. Crédito: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).....	15
Figura 5. Estapas da padronização do modelo de TAE associado a infecção sistêmica por <i>E. coli</i>	24
Figura 6. Cinética de crescimento tumoral em camundongos Balb/C (n=5), após indução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) com diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7) num período de sete dias. a) Ganho de peso corporal de animais. b) Peso em gramas do TAE (peso final – peso da carcaça). c) Volume do tumor após a centrifugação. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ significância quando comparado ao grupo 1×10^5 . ### $p < 0,00$, # $p < 0,05$ significância quando comparado ao grupo 1×10^6	31
Figura 7: Avaliação celular no líquido ascítico de Ehrlich coletado no sétimo dia após indução tumoral (TAE) em diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7). a)	

Número de células TAE. **b)** Viabilidade celular do TAE. **c)** Células TAE 1×10^5 aumento 100x. ** $p < 0,01$ significância quando comparado ao grupo 1×10^5 33

Figure 8. Análise do infiltrado leucocitário e células tumorais peritoneal de camundongos (n=5) Balb/c após sete dias da à indução do TAE em diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7). **a)** Leucócitos totais coletados a partir da lavagem peritoneal, contagem diferencial em microscópio óptico objetiva de 100 x, diferenciação celular feita em 100 células. **b)** Número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal. *** $p < 0,001$ significância quando comparado ao grupo 1×10^5 . ### $p < 0,001$ significância quando comparado ao grupo 1×10^6 34

Figure 9. Curva de sobrevida de camundongos Balb/C (n=5) desafiados com diferentes inóculos de *E. coli* ATCC 25922 (1×10^8 , 3×10^6 e 7×10^5) avaliados por 168 horas totalizando 7 dias.....35

Figura 10: Curva de sobrevida em camundongos Balb/C (n=5) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) 1×10^7 associado à infecção por *E. coli*. Os animais receberam o tumor de Ehrlich (i.p) ou salina 0,9% estéril (i.p). No sétimo dia da indução do tumor e inóculo com salina os animais foram infectados com diferentes inóculos (1×10^7 , 3×10^6 e 1×10^6 UFC) de *E. coli* ATCC 25922. Um grupo de animal com TAE recebeu apenas salina 0,9%. Os animais foram monitorados diariamente por 168 horas, 7 dias.....36

Figure 11. Cinética de crescimento tumoral do modelo de TAE associado a infecção sistêmica por *E. coli*. Ganho de massa corporal dos animais no intervalo de sete dias. * $p < 0,05$ significância Salina + Salina. * $p < 0,05$ significância Salina + *E. coli*.....37

Figura 12. Caracterização tumoral do modelo de TAE associado à infecção sistêmica por *E. coli*. **a)** Peso final - peso da carcaça para estimar em gramas o peso do tumor ao final de sete dias. **b)** Volume TAE após centrifugação **c)** Número de células tumorais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significância Salina+ Salina. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significância Salina+ *E. coli*.....38

Figura 13. Recuperação bacteriana do sangue e do lavado peritoneal de animais (n=5) em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. Seis horas após o inóculo da bactéria foi realizada a coleta do sangue total por punção cardíaca e coletado o lavado. Estes foram diluídos e semeados em micro gotas. Realizou-se a contagem do número de unidade formadora de colônias (UFC). Os resultados foram expressas com a escala $\text{Log}_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$. **a)** UFC de *E. coli* no sangue. **b)** UFC de *E. coli* lavado. Foram feitas triplicatas técnicas. *** $p < 0,001$ significância Salina+ Salina. ### $p < 0,001$ significância TAE+ *E. coli*. ** $p < 0,01$ significância salina + *E. coli*.....39

Figura 14. Análise do infiltrado leucocitário na cavidade peritoneal de camundongos (n=5) em modelo de TAE associado a infecção sistêmica por *E. coli*. **a)** Número total de leucócitos. **b)** Diferenciação da porcentagem celular dos leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos e macrófagos, analisado em microscópio óptico, objetiva 100x. *** $p < 0,001$ significância Salina+ Salina. ### $p < 0,001$ significância TAE + Salina. *** $p < 0,001$ significância Salina+ *E. coli*.....41

Figura 15. Dosagem de MPO e Recuperação bacteriana do pulmão de animais (n=5) em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. **a)** Na determinação da atividade da enzima MPO no pulmão, após os processos de lise 10 μ l do sobrenadante foi utilizado para dosagem da enzima. A análise da absorbância foi feita em ELISA, 450nm. Os dados foram expressos como número de neurófilo por 0,1g do pulmão. **b)** Na recuperação bacteriana do pulmão um lóbulo do pulmão de cada animal foi pesado e triturado em 0,8 mL de salina estéril 0,9%, foi feita a diluição seriada (sem diluição, 1:10, 1:100, 1:1000) e foi semeado em micro gotas em meio ágar MH. O número de unidade formadora de colônias (UFC) foi expresso com a escala $\text{Log}_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ de tecido. Foram feitas triplicatas técnicas. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ significância Salina+ Salina. ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ significância TAE+ Salina. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ significância Salina+ *E. coli*.....42

Figura 16. Avaliação da permeabilidade vascular em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. Os animais (n=5) receberam o tumor ou salina (i.p), após sete dias os animais foram infectados com *E. coli* ou receberam apenas salina, após dada 1h da infecção os animais receberam uma injeção intravenosa (plexo ocular) contendo

azul de Evans 20mg/kg .Seis horas após o inóculo os animais foi realizada a coleta do liquido ascítico, injetou-se 3mL de Salina/EDTA no peritônio e por punção intraperitoneal foi realizada a coleta do líquido. O Líquido coletado foi centrifugado e foi feita a leitura do sobrenadante em ELISA a 650nm. Foram feitas triplicatas técnicas de cada animal. Os resultados foram expressos como quantidade do corante azul de Evans $\mu\text{M.mL}^{-1}$, baseando-se numa curva padrão já conhecida do corante (100 μM - 0,001 μM).***P<0,001 significância a Salina+ Salina. ***p<0,001 significância a Salina+ *E. coli*.....43

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 - Fatores de Predisposição à Infecção em Pacientes com Câncer	
Fonte: (ZEMBOWER, 2014) Adaptado.....	17
Quadro 2 - Infecções Relacionadas a Doenças Subjacentes. Fonte: (ZEMBOWER, 2014) Adaptado.....	18

TABELAS DO APÊNDICE

Página

Tabela 1B. Padronização do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de *E. coli* ATCC25922 . Para a determinação de UFC.mL⁻¹, 200µL de um pré inóculo de *E. coli* em meio MH caldo, foi inoculado em 10mL de meio MH novo e após atingir a ~ 1,0 O.D foram feitas diluições seriadas e semeadas pelo método de micro gotas em meio MH ágar após 24horas foi feita a contagem das colônias. Foram feitas triplicatas biológicas e técnicas.....68

Tabela 2B. Número de unidades formadoras (UFC) de *E. coli* ATCC 25922 inoculadas nos animais para avaliação da curva de sobrevida. 200 µL de um pré inóculo de *E. coli* em meio MH caldo, foi inoculado em 10mL de meio MH novo e após atingir a ~1,0 O.D as cargas bacterianas foram determinadas baseando-se no número de UFC.mL⁻¹, após a inoculação nos animais os inóculos foram diluídos em série e semeados pelo método de micro gotas em meio MH ágar, após 24horas foi feita a contagem das colônias para confirmação do inóculo. Foram feitas triplicatas técnicas.....69

Tabela 1C. Número de unirdes formadoras (UFC) de *E. coli* ATCC 25922 inoculadas nos animais para avaliação da curva de sobrevida em animais com TAE e *E.coli*. 200µL de um pré-inóculo de *E. coli* em meio MH caldo, foi inoculado em 10mL de meio MH novo e após atingir a ~ 1,0 O.D as cargas bacterianas foram determinadas baseando-se no número de UFC.mL⁻¹, após a inoculação nos animais os inóculos foram diluídos em série e semeados pelo método de micro gotas em meio MH ágar, após 24horas foi feita a contagem das colônias para confirmação do inóculo. Foram feitas triplicatas técnicas.....70

FIGURAS DO APÊNDICE

Página

Figura 1A. Diferença corporal entre camundongos Balb-c sem indução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e com indução do tumor. **a)** Animal inoculado com salina. **b)** Animal após 7 dias de indução do TAE 1×10^767

Figura 1B. Curva de crescimento de *E. coli* ATCC 25922.Com o intuito de determinar a velocidade do crescimento bacteriano com o padrão de absorbância Uma colônia da bactéria foi inoculada em MH caldo e a cada 30min foi feita a leitura em espectrofotômetro até atingir a fase estacionária.....68

Figura 1C. Curva de sobrevivência de animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e infecção por *E. coli*. Após 7 dias da indução do tumor com TAE 1×10^7 os animais foram infectados com *E. coli* (EC) em diferentes cargas bacterianas ($\sim 1 \times 10^7$, 3×10^6 e 1×10^6 UFC). Os animais foram monitorados por 168 horas (7 dias) após a infecção.....70

Figura 1D. Ensaio de permeabilidade vascular em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. Os animais (n=5) receberam o Tumor ou salina (i.p), após sete dias os animais foram infectados com *E. coli* (ATCC 25922) 3×10^6 UFC ou receberam apenas salina, após dada 1h da infecção os animais receberam uma injeção no plexo ocular contendo azul de Evans 20mg.kg^{-1} . Dado seis horas do inóculo os animais foram anestesiados e eutanasiados. Foi realizada a coleta do líquido ascítico, injetou-se 3mL de Salina/EDTA no peritônio e por punção intraperitoneal foi realizada a coleta do líquido. O líquido coletado foi centrifugado e no sobrenadante foi feita a leitura em absorbância 650nm. Foram feitas triplicatas técnicas de cada animal. Os resultados foram expressos como quantidade do corante azul de Evans $\mu\text{M/mL}$, baseando-se numa curva padrão já conhecida do corante ($100 \mu\text{M}$ - $0,001 \mu\text{M}$). **1-** Exsudato após centrifugação. **a)** Salina + salina. **b)** Salina+ *E. coli*. **c)** TAE + *E. coli*. **d)** TAE + Salina. **2-** placa com sobrenadantes das amostras para leitura em ELISA.....71

RESUMO

Pacientes com câncer apresentam maior predisposição a infecções bacterianas, o que tem contribuído para o aumento da mortalidade e morbidade. Desta forma modelos experimentais representativos da associação de tumores a infecções são essenciais para caracterização dessas patologias, assim como para avaliação de potenciais tratamentos farmacológicos. Nesse trabalho objetivamos padronizar um modelo de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) associado à infecção sistêmica por *Escherichia coli*. Inicialmente avaliamos separadamente a evolução do TAE pela cinética de crescimento tumoral (volume, peso, números de células TAE e leucócitos) e a infecção sistêmica pela curva de sobrevida por *E. coli* em camundongos Balb-C. A partir desses resultados foram definidas 1×10^7 células do TAE e 3×10^6 UFC de *E. coli* para indução da co-infecção. Ao final de sete dias da inoculação do tumor os animais receberam *E. coli* para avaliação da sobrevida por 7 dias. Os demais animais que receberam o TAE associado à infecção apresentaram diminuição na taxa de sobrevida comparada aos grupos controles (Salina e *E. coli*; TAE e Salina; Salina e Salina). Posteriormente, animais com o TAE e infectados com *E. coli* foram avaliados após seis horas da infecção quanto a resposta inflamatória local, cinética de crescimento tumoral, número de bactérias no exsudato, sangue e pulmões, infiltração neutrofílica nos pulmões e avaliação da permeabilidade vascular. Foi possível observar que os animais submetidos à co-inoculação de TAE e *E. coli* não apresentaram diferenças na progressão do tumor. Entretanto observou-se um aumento no número de neutrófilos na cavidade peritoneal e nos pulmões, indicando uma exacerbação da resposta inflamatória local e sistêmica. Os resultados demonstraram que o TAE é capaz de aumentar a permeabilidade vascular, que é exacerbada pela infecção com *E. coli*. Sugere-se que aumento de permeabilidade em vasos do peritônio possa favorecer o acesso de bactérias à corrente sanguínea, desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica, com consequente infiltração bacteriana e neutrofílica nos pulmões, o que poderia explicar a diminuição da taxa de sobrevida em camundongos que foram inoculados com TAE e *E. coli*. Nossos dados sugerem que o modelo proposto é capaz simular os eventos fisiopatológicos que acometem pacientes com câncer em quadro de infecção sistêmica além de possibilitar estudos farmacológicos para elucidação de novas drogas multifuncionais com atividade imunomoduladora, antibacteriana e com atividade antitumoral. Também nos fornece um modelo para caracterização dos mecanismos envolvidos na união o tumor e infecção, além da possibilidade de análise de outras bactérias frente ao TAE para avaliação de mecanismos ou fármacos específicos para diferentes tipos de bactérias.

Palavras chave: câncer, tumor de Ehrlich, infecção, *Escherichia coli*, modelo murino.

ABSTRACT

Cancer patients are more likely to have bacterial infections, which has contributed to increased mortality and morbidity. In this way representative experimental models of the association of tumors with infections are essential for the characterization of these pathologies, as well as for the evaluation of potential pharmacological treatments. In this work, we aimed to standardize a model of Ehrlich ascites tumor (TAE) associated with systemic infection by *Escherichia coli*. Initially, we evaluated the evolution of TAE by tumor growth kinetics (volume, weight, numbers of TAE cells and leukocytes) and systemic infection by the *E. coli* survival curve in Balb-C mice. From these results, 1×10^7 TAE cells and 3×10^6 CFU of *E. coli* were defined for induction of co-infection. At the end of seven days of tumor inoculation the animals received *E. coli* for survival evaluation for 7 days. The other animals that received TAE associated with the infection had a decrease in the survival rate compared to the control groups (Salina and *E. coli*, TAE and Salina, Salina and Salina). Later, animals with TAE and *E. coli* infected were evaluated after six hours of infection for local inflammatory response, tumor growth kinetics, and number of bacteria in the exudate, blood and lungs, neutrophilic infiltration in the lungs and evaluation of vascular permeability. It was possible to observe that the animals submitted to co-inoculation of TAE and *E. coli* showed no differences in tumor progression. However, there was an increase in the number of neutrophils in the peritoneal cavity and in the lungs, indicating an exacerbation of the local and systemic inflammatory response. The results demonstrated that TAE is capable of enhancing vascular permeability, which is exacerbated by infection with *E. coli*. It is suggested that increased permeability in peritoneal vessels may favor the access of bacteria to the bloodstream, triggering a systemic inflammatory response, with consequent bacterial and neutrophilic infiltration in the lungs, which could explain the decrease in the survival rate in mice that were inoculated with TAE and *E. coli*. Our data suggest that the proposed model is able to simulate the pathophysiological events that affect cancer patients in systemic infection, besides allowing pharmacological studies to elucidate new multifunctional drugs with immunomodulatory, antibacterial activity and antitumor activity. It also provides us with a model for the characterization of the mechanisms involved in the union of the tumor and infection, besides the possibility of analysis of other bacteria against the TAE for evaluation of mechanisms or drugs specific for different types of bacteria.

Keywords: cancer, Ehrlich tumor, infection, *Escherichia coli*, murine model.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A palavra câncer vem do grego “*karkínos*” (caranguejo), teve essa denominação, pois segundo Galeno, médico romano, as regiões onde se encontravam a patologia apresentavam veias intumescidas circundantes que aparentavam as patas do caranguejo. Foi inserida no português pelo termo “*cancer*” do latim. Este termo tem sido usado genericamente para diversos tipos de patologias, que incluem dois fatores cruciais, crescimento desenfreado de células e capacidade de invasão e trauma em tecidos normais (DZIVENU; PHIL; O’DONNELL-TORM, 2015; WHO, 2017).

Os cânceres fazem milhões de reféns todo ano, e tem sido a causa de 12% de todas as mortes em todo mundo. Cerca de aproximadamente 30 milhões de pessoas estarão com câncer em 2020, e estima-se que a cada seis mortes uma é devido algum tipo de câncer. Os cânceres que tem mais relevância são pulmão, fígado, colo retal, estômago e mama (WHO, 2017).

Os cânceres podem ser classificados de acordo com o local em que se encontram como, por exemplo, carcinomas, epitélio dos órgãos, sarcomas, tecidos, linfomas, glândulas linfáticas, gliomas, tecido nervoso, melanoma, pele, dentre outros (COOPER, 2000; DZIVENU; PHIL; O’DONNELL-TORM, 2015). Ainda não se sabe ao certo a etiologia do câncer, mas supõe-se e vêm sendo demonstrado que a herança genética e fatores ambientais têm papéis importantes em alguns tipos de cânceres, sendo que a exposição a agentes químicos também podem levar a determinados tipos de cânceres (PFEIFER, 2010, 2015).

Segundo (HANAHA; WEINBERG, 2000, 2011) para que uma célula normal transforme em célula cancerosa existe um padrão lógico de traços característicos que regem essa transformação sendo eles sustentar a sinalização proliferativa, escapar de supressores de crescimento, evitar a destruição imunológica, permitir à imortalidade replicativa, a participação da inflamação como indutora de tumores, ativação da invasão e metástases, indução da angiogênese, a instabilidade genômica e mutações, resistir à morte celular e reprogramação do metabolismo energético (Figura1). Estas características citadas acima juntamente com a

descoberta de uma gama de células normais envolvidas no microambiente tumoral vêm ajudando a caracterizar e a entender a biologia do tumor.

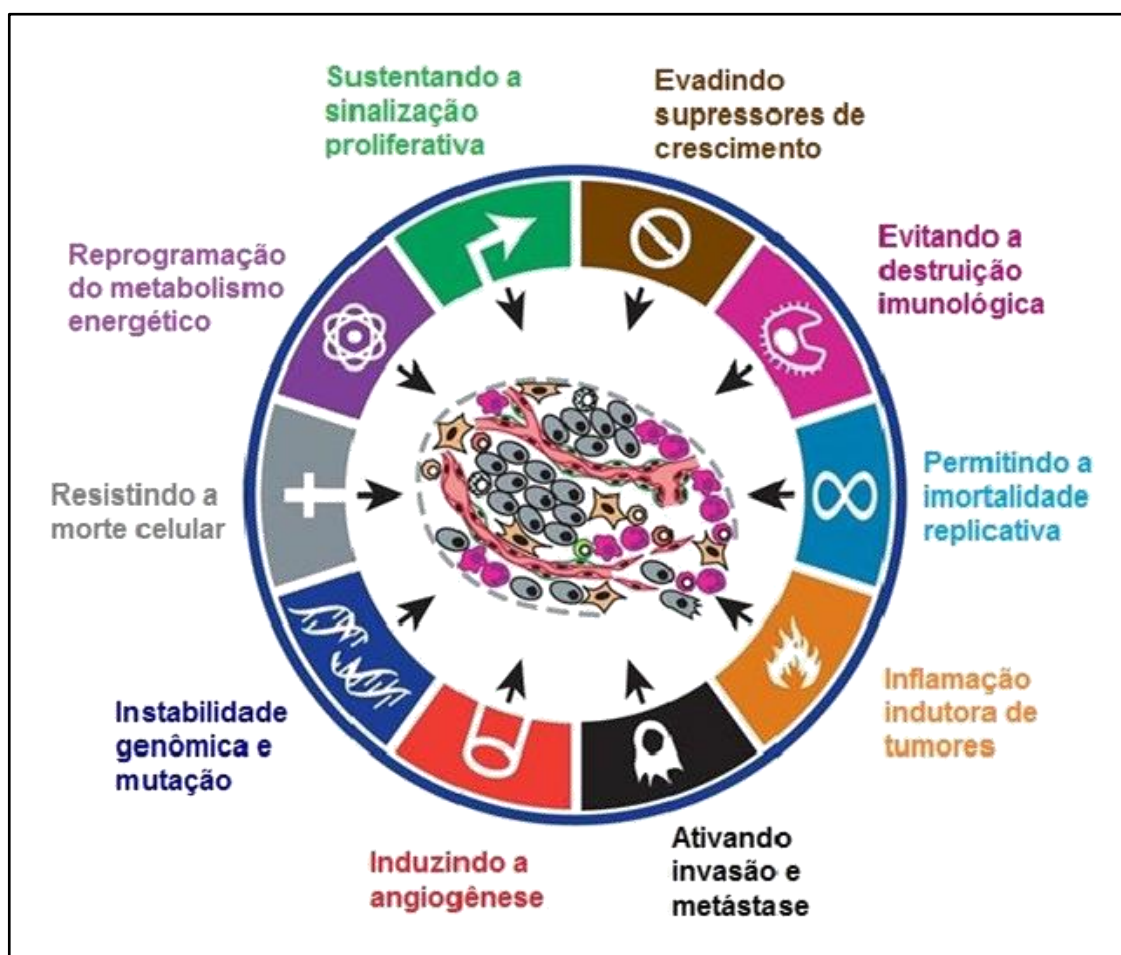


Figura1. Traços característicos na formação do tumor. Fonte:(HANAHAN; WEINBERG, 2011)

Estudos recentes têm demonstrado que as células tumorais são altamente heterogêneas e apresentam grande plasticidade, diferentes fenótipos e subpopulações (BROCK; KRAUSE; INGBER, 2015). Essa heterogeneidade fenotípica pode ser hereditária ou não hereditária, resultantes da variabilidade genética, que pode diferenciar quanto à capacidade da formação de metástases e sobrevivência a terapia do tumor (MARUSYK; ALMENDRO; POLYAK, 2012).

Existem pesquisas que sugerem que a carcinogênese pode não estar somente ligada à sinalização celular, mas pode se apresentar intimamente ligada ao processo de inflamação (BLAYLOCK, 2015). E alguns pesquisadores demonstraram que vários agentes cancerígenos levam ao câncer pelo processo inflamatório crônico (READ; DOUGLAS, 2014).

O processo de carcinogênese ou tumorigênese pode ser constituído por três fases cruciais e se mostra como um processo dinâmico e complexo, sendo elas: iniciação, promoção e progressão tumoral sendo que estas fases podem estar intimamente ligadas (PITOT, 1993; SIDDIQUI et al., 2015; WESTON; HARRIS, 2003). No processo de desenvolvimento tumoral a primeira fase é o processo de iniciação, que pode ser desencadeado por fatores genéticos, agentes químicos, físicos ou biológicos, esses iniciadores causam danos no DNA. Após a iniciação o processo de iniciação se torna irreversível, por sua vez uma célula mutante, gera células filhas com as mutações iniciais, que podem levar a promoção tumoral, segunda fase da carcinogênese. No processo de promoção pode haver ação de promotores (específicos ou inespecíficos) que podem levar a proliferação das células mutantes. Nessa fase, o tumor ainda não se encontra em estado de malignidade, mas para que o tumor alcance a segunda fase de progressão tumoral, vai depender do efeito dos promotores na expansão clonal das células iniciadas, que podem levar a terceira fase, progressão tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; KLAUNIG; KAMENDULIS; XU, 2000; LIU et al., 2015) (Figura 2).

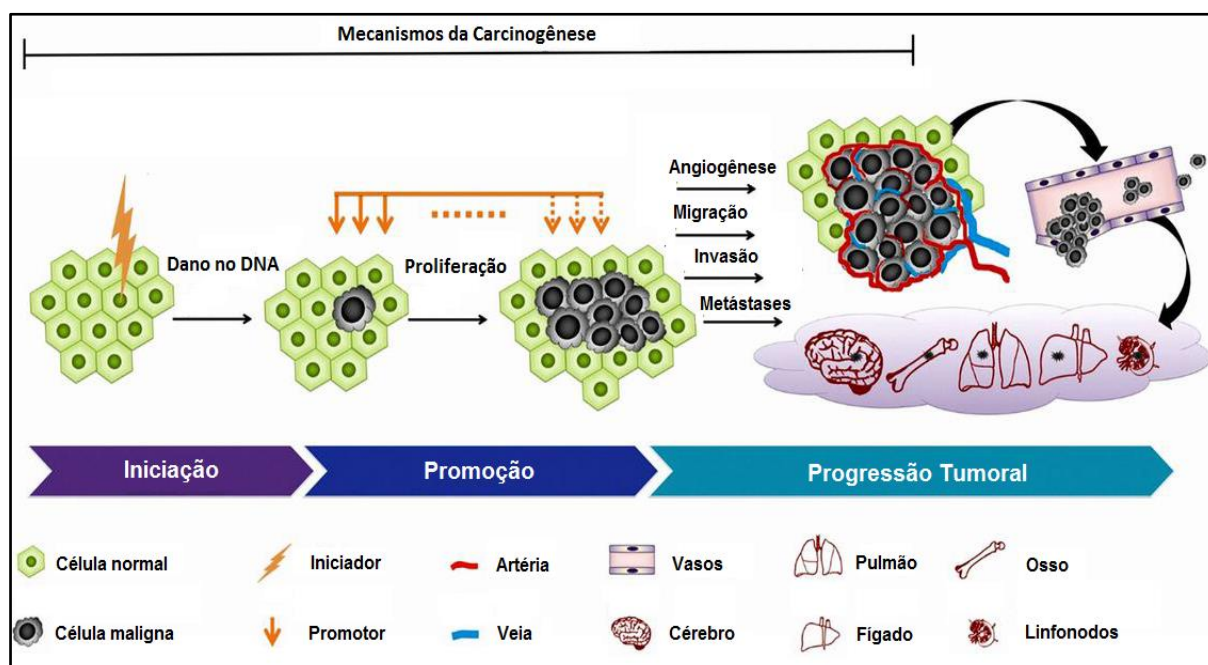


Figura 2. Fases da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão tumoral. Fonte: (LIU et al., 2015) Adaptada.

Disponível em: <http://qims.amegroups.com/article/view/7044/8821>.

Na fase de progressão tumoral podem ocorrer diversificadas transformações nas células neoplásicas, que podem potencializar o estado de malignidade das células. Juntamente com a proliferação exacerbada das células tumorais, pode ocorrer a angiogênese (formação de vasos)(ZIYAD; IRUELA-ARISPE, 2011), nessa fase a resposta do hospedeiro assim como o aumento celular tumoral pode levar a produção de citocinas e mediadores inflamatórios(LANDSKRON et al., 2014), que podem acarretar danos aos endotélio aumentando a permeabilidade vascular (PAPADOPOULOS et al., 2004), em contraste a permeabilidade permite a invasão das células tumorais (metástases) nos vasos linfáticos ou sanguíneos podendo levar a disseminação das células tumorais para outros órgãos ou tecidos (Figura 2). Nesse último caso o processo pode se tornar irreversível acometendo a morte do organismo. Uma vez disseminadas as células neoplásicas podem ter capacidade de se proliferar em outros tecidos e órgãos, podendo acometer diversificadas complicações ao organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2011; KLAUNIG; KAMENDULIS; XU, 2000; LIU et al., 2015; VALASTYAN; WEINBERG, 2011).

1.1.1 Imunologia do câncer

As células tumorais podem apresentar em sua superfície antígenos como os produtos de oncogenes que as diferencia das células normais, podendo possibilitar o reconhecimento e eliminação das células neoplásicas pelo sistema imune. Este reconhecimento pode ser feito de diferentes formas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; BEACHY; KARHADKAR; BERMAN, 2004; COUSSENS; WERB, 2002). No microambiente tumoral encontram-se células “*Natural Killer*” NK, linfócitos T CD4+ e T CD8+ específicos para células tumorais, macrófagos ativado e imunoglobulinas que podem desempenhar um papel importante contra os antígenos das células tumorais (Figura 3) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; BEACHY; KARHADKAR; BERMAN, 2004; CHEN et al., 2007; EYERICH et al., 2009; RODRIGUES, 2013).

Para efetiva eliminação das células tumorais pode ser preciso o trabalho concomitante da imunidade inata e da imunidade adaptativa. Podendo gerar uma resposta imune celular e humoral respectivamente(ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; COUSSENS; WERB, 2002). Dentro da imunidade celular contra as células neoplásicas se têm como principal efetor os linfócitos T CD8+ citotóxico que são

responsáveis pela produção de algumas citocinas como, interleucina 2 (IL-2), interferon γ (INF- γ), interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (DE JONG; MAINA, 2010a; NISHIMURA et al., 1999). Com a produção destas citocinas há a possibilidade de uma comunicação entre a resposta imune inata com a adaptativa pelos linfócitos T CD4+, podendo demonstrar eficácia na resposta antitumoral. Já a produção de quimiocinas e TNF- α , podem desempenhar um papel crucial no recrutamento de células leucocitárias como neutrófilos, pois esta citocina pode atuar no endotélio propiciando o recrutamento destas células para o local da inflamação (DUDLEY et al., 2002; MACCALLI; SCARAMUZZA; PARMIANI, 2009; RODRIGUES, 2013; SICA; MANTOVANI, 2012). A produção de citocinas pelos linfócitos TCD4+ pode ter um papel importante na ativação e diferenciação de eosinófilos, sendo estes e os mastócitos encontrados em grande quantidade nas respostas inflamatórias antitumorais (COUSSENS; WERB, 2002; NISHIMURA et al., 1999).

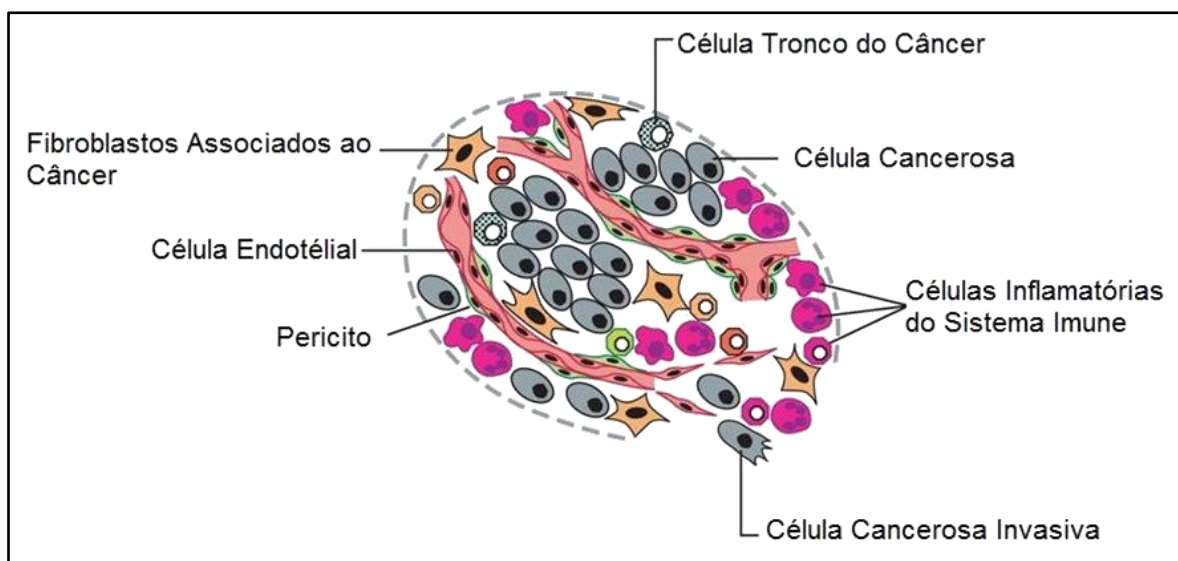


Figura 3. Células presentes na origem do tumor. Fonte: (HANAHAAN; WEINBERG, 2011) Adaptado.

As glicoproteínas imunoglobulinas podem desempenhar um papel fundamental na indução da citotoxicidade, mediada por anticorpos ativando o sistema complemento contra células neoplásicas. A ligação dessas imunoglobulinas a superfície tumoral pode propiciar também o reconhecimento pelos macrófagos e células NK (*Natural Killer Cell*), podendo induzir a lise celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; DE JONG; MAINA, 2010b; HAMANN et al., 1997).

Pela linha de defesa imune inata podem ser encontrados os macrófagos com importante papel antitumoral. Estas células podem ter capacidade de produção de diversificadas citocinas, e liberação de enzimas lisossômicas, o que poderia levar a produção de espécies reativas de oxigênio como óxido nítrico (NO) que podem ajudar no combate das células tumorais. Outro fator importante dos macrófagos pode ser a produção de TNF- α que induz a apoptose de células tumorais (DE JONG; MAINA, 2010b; DUDLEY et al., 2002; KAWANISHI et al., 2006, 2017, MACCALLI; SCARAMUZZA; PARMIANI, 2009, 2009; MURATA et al., 2012; RODRIGUES, 2013).

Mesmo apresentando todos os mecanismos de defesa o sistema imune pode ser ineficaz. As células tumorais em sua maioria podem desenvolver mecanismos de escape contra a defesa do sistema imune. Uma dessas possíveis facetas pode ser a diminuição da expressão das moléculas de MHC (*Major Histocompatibility complex*) de classe I (HARMEY et al., 2002; KAGESHITA et al., 1999; STEEG, 2006). As células tumorais podem ser capazes de expressar proteínas como TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*.) que suprimem a resposta imunológica possibilitando assim a progressão tumoral (DUDLEY et al., 2002; FLAVELL et al., 2010; OPPENHEIM et al., 2003; RODRIGUES, 2013). A ineficácia do próprio organismo em conseguir eliminar o tumor leva a busca por medidas terapêuticas que podem conseguir, de certa forma, eliminar ou controlar o crescimento tumoral (HOWELL; COLVIN, 2014).

1.1.2 Tratamento do câncer

Quanto ao tratamento do câncer atualmente existem cinco práticas comuns utilizadas na clínica, a cirurgia para remoção do tumor, a radioterapia, a quimioterapia, a imunoterapia e a terapia direcionada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; PRADO, 2014; SUS, 2014).

Quanto ao procedimento cirúrgico esse pode se dar para prevenir, diagnosticar, paliar ou tratar o câncer. Por exemplo, na cirurgia para diagnóstico, tem-se a remoção de uma parte do tumor para biópsia. Já a cirurgia para análise do estágio tumoral consiste em uma cirurgia mais rigorosa em que se avalia tanto a parte afetada assim com os tecidos e gânglios circundantes do tumor, os quais podem ser removidos com o objetivo de prevenção. A cirurgia preventiva pode ser utilizada na

maioria das vezes em que se tem um diagnóstico familiar ou por meio do aconselhamento genético. Além dessas cirurgias existem as cirurgias reparadoras, paliativas e de *Debulking* (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; HOSOYA et al., 2010; LEE et al., 2010)

A radioterapia representa-se como uma das ferramentas mais comuns no tratamento do câncer local. Essa técnica vêm sendo aprimorada de acordo com os avanços tecnológicos, mas se resume em inserção de um feixe de luz ionizante guiada por imagens em regiões alvo onde se encontram os tumores, podendo ocasionar a morte celular e tecidual (JOUBERT et al., 2011a; XING et al., 2006). A radioterapia consiste em uma técnica que ainda pode acometer danos ao paciente, devido a falta de precisão na entrega da radiação, o que pode acometer a morte de células normais e tecidos adjacentes, impossibilitando assim a total irradiação em pacientes com um quadro mais agravante de metástases (JOUBERT et al., 2011b; SHAH et al., 2011; XING et al., 2006). Em vista disto a radioterapia na maioria dos casos pode ser utilizada concomitantemente a quimioterapia (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015) .

O tratamento quimioterápico seja por alquilantes, anti-metabólitos, antibióticos ou inibidores mitóticos, têm sido uma das ferramentas mais eficazes no combate aos cânceres mais desenvolvidos em que apresentam metástases (migração das células tumorais pela corrente sanguínea ou vasos linfáticos) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; SUS, 2014). Essa técnica consiste na inibição da divisão celular, implicando na morte de células que podem apresentar alta taxa de replicação celular, característica crucial da progressão tumoral. Em contrapartida a quimioterapia pode afetar diretamente diversas células no organismo do paciente que estão em replicação constante como, por exemplo, as células dos folículos capilares o que provoca queda do cabelo, células presentes no trato gastrointestinal e as células da medula óssea (CHA; EASTHAM, 2015; PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015; SELLE et al., 2016). Existem inúmeros esforços na caracterização e produção de novos fármacos mais específicos e potentes contra as células tumorais, mas existem algumas características peculiares das células tumorais como a alta taxa de diferenciação celular e a replicação exacerbada o que dificulta a especificação de medicamentos alvos (SELLE et al., 2016). Sabe-se que na medula óssea ocorre a produção das células de defesa do organismo, sendo que a exposição à agentes quimioterápicos por longos períodos pode acometer um

quadro de imunodepressão ao paciente, proporcionando um ambiente ideal para diferentes tipos de infecções (ISHII et al., 2016; LUSTBERG, 2012).

1.1.3 Modelos experimentais para estudo do câncer

Por muitos anos modelos experimentais de câncer tem desempenhado um papel importante nas descobertas de novas drogas terapêuticas(CHEON; ORSULIC, 2011; KABEL; ELMAABOUD, 2014). Os modelos de câncer “*in vivo*” podem ser divididos em duas grandes classes sendo elas, modelos transplantáveis que atualmente são os mais utilizados na avaliação de fármacos, e os modelos “*in situ*” com a utilização de camundongos transgênicos podendo oferecer informações sobre a etiologia do câncer (TALMADGE et al., 2007).

Dentre os modelos transplantáveis, o tumor de Ehrlich (TE) têm sido um dos mais utilizados. O TE a princípio se deu como um tumor mamário espontâneo em murídeos. A partir daí o TE foi caracterizado e transplantado em forma sólida pela injeção subcutânea. foram os primeiros a padronizar e descrever o TE a forma ascítica denominado tumor ascítico de Ehrlich (TAE) pela injeção intraperitoneal do tumor. Após 1948 as células TAE já haviam se espalhado rapidamente em todos os centros de pesquisas ao redor do mundo. Ao longo do tempo foram feitas adequações do TAE para análises quantitativas e qualitativas(FERNANDES et al., 2015; KLEIN, 1950; QUEIROZ et al., 2004).

O TAE pode ser caracterizado como um tumor indiferenciado, podendo exibir alta capacidade de transplante sem regressão, rápida proliferação podendo chegar a 100% de malignidade e pode apresentar sensibilidade a quimioterapia, similar aos tumores humanos(HUDACK; BAKER, 1961; KLEIN, 1950; QUEIROZ et al., 2004).

A razão para uso do modelo TAE advém do fato que a suspensão de células tumorais livres pode ser homogênea. Deste modo o TAE pode viabilizar o transplante quantitativo de uma carga parecida de células tumorais para outros animais, o que pode promover também a determinação da gravidade do tumor apenas pelo número de células injetadas nos animais(FERNANDES et al., 2015; QUEIROZ et al., 2004).

Segundo Fernandes e colaboradores (2015), que caracterizaram a resposta inflamatória do TAE, demonstraram que logo após a inoculação intraperitoneal das células TAE no camundongo, pode haver um aumento rápido no volume do líquido

ascítico e na concentração proteica. O número de células TAE pode permanecer estável até o oitavo dia em conformidade com o número de células TAE inoculadas nos animais. Com a progressão do TAE pode haver um aumento de leucócitos no sangue, diminuição de eritrócitos como também a possibilidade do aumento de monócitos. O número de neutrófilos pode não sofrer variação durante a progressão tumoral.

Até o décimo dia, após a inoculação, pode ocorrer um aumento progressivo de IL-1 β , e dos níveis de IFN- γ . Pode-se observar um aumento significativo de prostaglandina E2 (PGE) e óxido nítrico (NO). No décimo quarto dia pode-se observar um pico de IL-10 e proteínas quimiotáticas de monócitos 1 (MCP-1). Baseando-se nessas informações o TE até hoje tem sido muito utilizado, seja na forma ascítica ou na forma sólida, mostrando que este modelo consiste em um modelo válido, na caracterização de novas terapêuticas (FERNANDES et al., 2015; HUDACK; BAKER, 1961; QUEIROZ et al., 2004).

1.2 Infecções bacterianas

As infecções bacterianas principalmente as infecções por bactérias resistentes estão entre as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo inteiro (WHO, 2017). Algumas bactérias são de extrema importância para defesa do ser humano e fazem uma linha de defesa contra outros microrganismos oportunistas. Só que ao mesmo tempo um desequilíbrio da comunidade bacteriana presente no organismo, ou mesmo por contaminação com um tipo diferente de bactéria presente no ambiente externo pode levar a um quadro de infecção bacteriana. Sendo assim uma doença infecciosa é aquela em que o patógeno invade um hospedeiro suscetível (ALBERTS et al., 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Para que ocorra a infecção, os patógenos precisam entrar em contato com o hospedeiro por portas de entradas, como membranas mucosas, pele ou via parenteral. Também pode ser dependente do número de células bacterianas, sendo que se existir uma pequena quantidade de bactérias, o sistema imune do hospedeiro consegue eliminá-las. Cada tipo específico de bactéria pode apresentar diferentes mecanismos de contaminação (CARRUTHERS; COTTER; KUMAMOTO, 2007a; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Tipicamente, as bactérias podem abranger divergentes tipos de mecanismos que asseguram a sua disseminação no organismo hospedeiro. Um dos principais mecanismos pode ser a capacidade de adesão. Praticamente todas as bactérias patogênicas ou não patogênicas apresentam moléculas (adesinas ou ligantes) em sua superfície que as permitem aderir a receptores *Tool-Like* (TRE) complementares presentes em diferentes superfícies dos tecidos dos hospedeiros (HORI; MATSUMOTO, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Com a finalidade de ludibriar o sistema de defesa do hospedeiro alguns microrganismos detêm diferentes tipos de estratégias morfológicas e químicas, como presença de cápsula, variação na composição química da parede celular (proteína M), produção de enzimas (coagulases, quinases, collagenases, hialuronidase e proteases), capacidade de variação antigênica e capacidade de penetração no citoesqueleto das células hospedeiras (CARRUTHERS; COTTER; KUMAMOTO, 2007b; MACHADO et al., 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os danos provocados pelos patógenos às células do hospedeiro dependem da disposição de nutrientes do hospedeiro. As bactérias podem lesionar a região invadida como também podem afetar regiões distantes do sítio inicial da infecção pela presença de componentes celulares tóxicos instigando a hipersensibilidade ao organismo hospedeiro, como as exotoxinas e endotoxinas (LPS) presentes em bactéria Gram-positivas e negativas respectivamente (CARRUTHERS; COTTER; KUMAMOTO, 2007b; MACHADO et al., 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Em um ponto de vista lógico as pessoas mais susceptíveis a infecções bacterianas são aquelas que se encontram com a saúde debilitada em um contexto de deficiência imunológica, deixando uma porta de entrada para os micróbios oportunistas. Atualmente fala-se muito em resistência bacteriana e a dificuldade de tratamento principalmente em pessoas nos ambientes hospitalares. A resistência bacteriana se refere à capacidade adaptativa da bactéria desenvolver mecanismos de escapes contra antibióticos. Além de aprimorar os mecanismos de resistência as bactérias podem apresentar aparatos de comunicação célula/célula que podem possibilitar a troca de informações entre diferentes tipos de estirpes bacterianas, disseminando os mecanismos de defesas entre elas dificultando o controle e tratamento. Uma das principais causas que pode ter desencadeado a resistência a resistência bacteriana pode ter sido o uso excessivo de antibióticos e conduta inadequada no controle da administração dos medicamentos (DAMASCENO et al.,

2008; HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008; SYDNOR; PERL, 2011; VENTOLA, 2015; WALKER; BEATSON, 2012).

Em doenças humanas as bactérias Gram-positivas mais comuns e relevantes incluem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, e *Bacillus anthracis*, sendo que a invasão num hospedeiro suscetível pode ocasionar morbidade e mortalidade significativa (LEE et al., 2009). Infecções causadas por bactérias Gram-positivas multirresistentes pode representar um problema de saúde pública, não apenas em termos de morbidade e mortalidade, mas também em termos econômicos. *S. aureus* e *Enterococcus spp.* pode se dizer que apresentam-se como patógenos estabelecidas no ambiente hospitalar, e sua frequente multirresistência é um complicador nas terapias existentes (WOODFORD; LIVERMORE, 2009).

Dentre as bactérias Gram-negativas que podem provocar danos em ambientes hospitalares estão *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter species*. Os bacilos Gram-negativos causam os tipos mais frequentes de infecções hospitalares como gastroenterites, pneumonia, infecção de sítio cirúrgico, infecção do trato urinário e infecção da corrente sanguínea, sepse (GAYNES; EDWARDS, 2005; PELEG; HOOPER, 2010).

As infecções sistêmicas podem levar a um quadro mais grave denominado sepse. Frente à infecção, o organismo do hospedeiro pode apresentar uma resposta inflamatória exacerbada, com produção de citocinas e mediadores inflamatórios levando a um aumento da permeabilidade vascular e consequentemente, levando à disfunção orgânica podendo levar a falência dos mesmos e morte do hospedeiro (LEVER; MACKENZIE, 2007; VAN DER POLL et al., 2017).

A sepse pode ser desencadeada pela presença na corrente sanguínea de toxinas presentes na parede celular das bactérias como as exotoxinas nas Gram-positivas (ácido lipoteicóico, LTA) assim como as endotoxinas presentes nas Gram-negativas (Lipopolissacarídeo, LPS) (BUER; BALLING, 2003). No sítio da infecção há uma produção de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 β (IL1 β), IL-12 e IL-18 (WIERSINGA et al., 2014), ativando a primeira linha de defesa, o sistema imune inato, com a migração de células de defesas (neutrófilos e macrófagos) para o sítio da infecção (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011). Se por algum motivo há um desequilíbrio na homeostase do organismo, tanto a produção de citocinas como o aumento de células de defesa pode provocar um desencadeamento de uma resposta

inflamatória descontrolada, ativando o sistema complemento, assim como a cascata de coagulação, aumento da permeabilidade vascular, podendo gerar um colapso cardiovascular ou a falência múltipla dos órgãos (VAN DER POLL et al., 2017).

1.2.1 Modelos de infecções bacterianas

Os camundongos (*Mus musculus*) são organismos ideais para compreender as doenças infecciosas humanas, pois apresenta 90% de semelhança com o sistema imunológico humano. E esta proximidade pôde ser comprovada após a caracterização do seu genoma, o qual foi comparado com o genoma humano observando a similaridade dos dois (BUER; BALLING, 2003; CHURCH et al., 2009; PLETZER et al., 2017). Existem trabalhos que relatam a utilização de modelos animais de infecção sistêmica, local ou cutânea com patógenos que infectam os seres humanos (FINK, 2014; KIM; MISSIAKAS; SCHNEEWIND, 2014; PLETZER et al., 2017).

Para Buer e Balling (2003), a utilização de camundongos no estudo de infecções bacterianas auxilia nas pesquisas de diversas doenças infecciosas, incluindo bacterianas, virais e parasitárias. Para delinear um panorama da doença humana por agentes patogênicos, os animais são de suma importância, pois, através dos modelos animais, pode-se obter informações quanto à base molecular da patogenia, o funcionamento da imunidade, entre outras características (JELICKS et al., 2013; TALMADGE et al., 2007; WILES et al., 2006; ZIMMERLI et al., 1982).

Existem atualmente diversos modelos de infecções em camundongos, podendo variar de acordo com suas linhagens associadas com diferentes estirpes bacterianas. Com o avanço tecnológico na área da genômica o camundongo vem se tornando uma ferramenta essencial na manipulação genética. Existem animais com inclusões de genes específicos “*Knock-ins*”, assim como a excisão de genes “*Knockouts*” possibilitando a investigações biológicas mais acuradas e personalizadas (SANDS, 2003).

Quanto às infecções bacterianas pode se encontrar um arsenal de estirpes com possibilidade de inoculação em camundongos, permitindo a caracterização da infecção, assim como avaliação de potenciais terapêuticos (ANDES; CRAIG, 2002; ANDRÉJAK et al., 2015; MCCULLERS; REHG, 2002; SILVA et al., 2016). O grau de mortalidade da infecção é avaliado antes dos testes padrões com auxílio da curva de

sobrevida dos animais, que normalmente pode ser feita com diferentes cargas bacterianas possibilitando delimitar o grau da infecção em letal e não letal.

A capacidade de infecção também pode variar em conformidade ao local de inoculação e a estirpe bacteriana a ser utilizada. Existem diversas vias de inoculação das bactérias e esta, pode variar de acordo com o tipo de doença preterida a simular o que acomete os humanos. Podem ser infecções locais em diferentes tipos de órgãos como, por exemplo, infecções por *K. pneumoniae* por via inalatória, tendo como alvo o pulmão, simulando a pneumonia (NISHI; TSUCHIYA, 1980; RENOIS et al., 2011). Inoculação de *S. aureus* em ferida cutânea também é um modelo muito utilizado, pois este patógeno pode estar associado a infecções da pele (KUGELBERG et al., 2005; MALACHOWA et al., 2013). Modelos que simulem o quadro de sepse, como ligação e perfuração do ceco (CLP) do animal podendo levar a uma infecção polimicrobiana (DEJAGER et al., 2011), pela inoculação de endotoxinas (LPS), pela inoculação de bactérias vivas isoladas ou pelo inóculo de um “pool” polimicrobiano por via sistêmica intraperitoneal (DEJAGER et al., 2011; FINK, 2014; POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008; RITTIRSCH et al., 2009; STARR et al., 2014).

O modelo de infecção por *E. coli* têm sido utilizado para simular o quadro de sepse que pode acometer humanos. Este modelo consiste em uma injeção intraperitoneal desta bactéria levando em conta o número de unidades formadoras de colônias (UFC), variação da estirpe bacteriana e virulência (DOI et al., 2009; LEE et al., 2017; SAÚDE et al., 2014). Infecção bacteriana por *E. coli* pode ser associada a uma resposta cardiovascular hiperdinâmica, semelhante com a observada em humanos e, o agravamento do quadro de sepse pela infecção, pode ocasionar a morte do animal nas primeiras 48 horas experimentais. É possível observar também que nos animais sobreviventes quando há um tratamento farmacológico provoca respostas metabólicas e inflamatórias até cinco dias após a indução da infecção por *E. coli* (LEE et al., 2017; SAÚDE et al., 2014).

1.2.2 Infecção causada por *E. coli*

E. coli consiste em uma bactéria Gram-negativa encontrando-se incluída á família das Enterobacteriaceae. Morfologicamente apresenta-se em forma de bacilos coliformes, com flagelos e geralmente são munidas de endotoxinas (LPS) (Figura4).

E. coli é um dos microrganismos mais comuns no trato intestinal dos seres humanos sendo inofensivas ao organismo. As bactérias *E. coli* patogênicas são providas de fímbrias que favorecem a adesão no tecido intestinal e produzem toxinas que ocasionam uma disfunção intestinal denominada gastroenterite. Além disso podem acometer outros distúrbios ao organismo hospedeiro, como infecções no trato urinário, no sistema nervoso e na corrente sanguínea (Sepse) (CROXEN; FINLAY, 2010; NATARO; KAPER, 1998)

A contaminação por *E. coli* pode ocorrer principalmente por meio de alimentos contaminados com fezes podendo estar associada à falta de higiene e saneamento básico. Anualmente as infecções por *E. coli* entero patogênicas atingem cerca de milhares de pessoas em países subdesenvolvidos, sendo responsável por milhares de mortes e a classe que pode ser mais atingida por este tipo de patógeno são as crianças menores de 5 anos (DONNENBERG et al., 2015; OCHOA; CONTRERAS, 2011).

Existem três síndromes clínicas distintas que podem ser motivada por *E. coli* patogênicas, as infecções entéricas/diarreicas, infecções no trato urinário e a sepse. Dentro da classificação das *E. coli* diarreicas pode-se distinguir-se oito diferentes tipos patogênicos de *E. coli* de acordo com o grau de patogenia. As *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC), *E. coli* entero hemorrágica (EHEC), *E. coli* entero toxigênica (ETEC), *E. coli* entero patogênica (EPEC), *E. coli* entero invasiva (EIEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* aderente e invasiva (AIEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga entero agregativa (STEAEC) (CDC, 2015; CLEMENTS et al., 2012; LIEBCHEN et al., 2011).

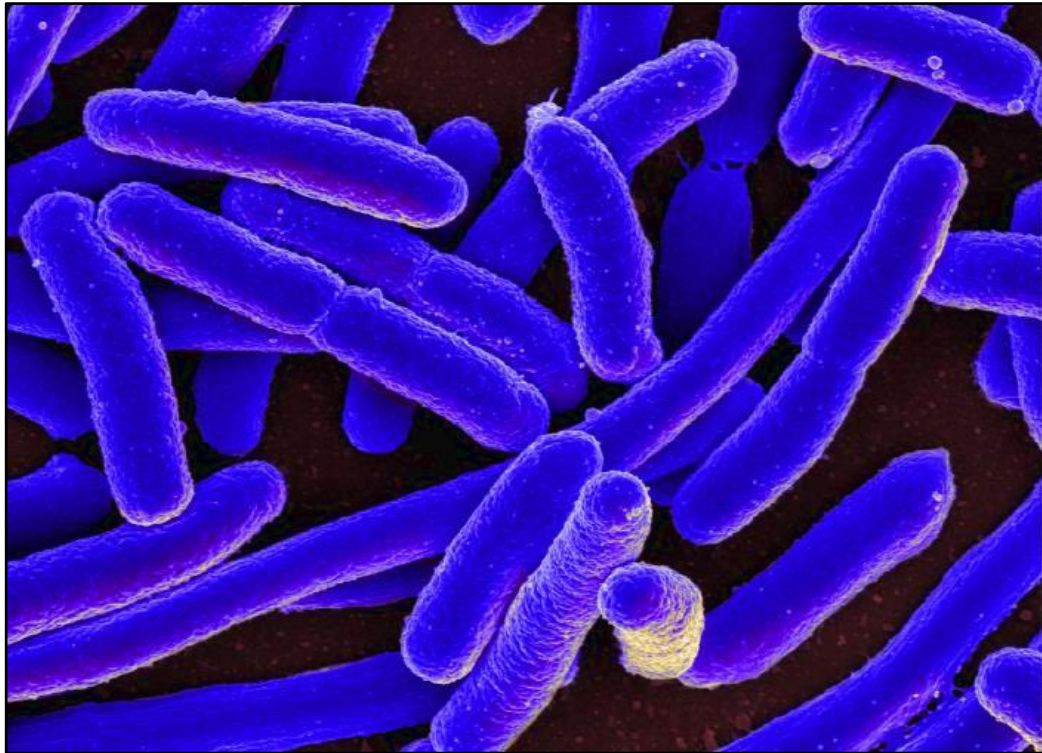


Figura 4. Micrografia eletrônica de varredura colorizada de uma colônia de *Escherichia coli*. Fonte: (<https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>) ID: 18160 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Public Health Image Library (PHIL), 2002. Crédito: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).

Dentre as infecções causadas por *E. coli* extra intestinais (ExPEC), atualmente existem dois tipos de patógenos comuns: a *E. coli* uropatogênica (UPEC) que acarreta danos ao trato urinário podendo ocasionar sepse (SEPEC) e ameningite causada pela *E. coli* de meningite neonatal (NMEC)(CLEMENTS et al., 2012).

As infecções pelas ExPEC possuem fatores de virulência característicos como presença de adesinas e proteases, fatores estes que permitem a invasão tecidual. Estas infecções também apresentam fatores que conseguem burlar o sistema imune do hospedeiro como, por exemplo, a presença da cápsula, impedindo assim o reconhecimento das células fagocitárias, proporcionando a colonização bacteriana. A liberação de endotoxinas (LPS) também pode ocorrer por estes patógenos Gram-negativos. Na corrente sanguínea estas endotoxinas podem aumentar relativamente à indução de patologias mais agravantes como sepse e choque séptico (KÖHLER; DOBRINDT, 2011; SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2007).

1.3 Infecções bacterianas em pacientes com câncer

O desenvolvimento do câncer pode ser um processo longo, podendo envolver severas alterações no corpo, tais como alterações fisiológicas, imunológicas, bioquímicas, anatômicas e inclusive, na microbiota normal do indivíduo (Khan *et al.*, 2012). Essas alterações podem levar a desregulação da homeostase do organismo propiciando assim o crescimento tumoral desordenado como também, a infecção por patógenos externos, ou presentes no próprio organismo (Visser *et al.*, 2006). Além da própria desregulação da homeostase do organismo causada pelo câncer, o organismo do paciente pode ser enfraquecido pela administração de imunossupressores, drogas citotóxicas, ou mesmo a utilização de dispositivos médico-hospitalares, como tubos endotraqueais, cateteres, entre outros equipamentos, (WALKER; BEATSON, 2012). No Quadro 1 são citados alguns fatores que predispõe a infecção em pacientes com câncer.

As complicações infecciosas atingem principalmente os pacientes com doenças hematológicas malignas cerca de 60% dos casos de óbito é devido às infecções, e cerca de 50% dos óbitos em pacientes com tumores sólidos, apresentam algum tipo de infecção (CHANG *et al.*, 1976; HOMSI *et al.*, 2000). Os pacientes que se encontram no estado de neutropenia profunda estão susceptíveis a varias infecções sendo que as infecções bacterianas podem ser predominantes (FREIFELD; KAUL, 2013; MASCHMEYER *et al.*, 2015). As infecções documentadas clinicamente ocorrem de 20% - 30% de episódios febris, sendo que os sítios de infecção mais comuns incluem a pele, o pulmão, sistema urogenital e o trato intestinal (RAMPHAL, 2004).

As infecções em pacientes com câncer também estão associadas ao uso de cateteres. Que podem ser infecções hematogênicas por estafilococcus ou infecções polimicrobianas associadas ao uso de cateteres venosos em crianças (NIEBOER *et al.*, 2008; OTT *et al.*, 2013).

Atualmente a quimioterapia se mostra como a melhor ferramenta no tratamento do câncer, mas pode gerar um quadro de neutropenia o qual está associado a infecções em pacientes com câncer (SAFDAR; ARMSTRONG, 2011; VIDAL *et al.*, 2004). A neutropenia pode ser caracterizada pela queda do número de neutrófilos em que a contagem diminui para $<1000 \text{ células/mm}^3$, aumentando assim a susceptibilidade à infecção, pois diminui a resposta imunológica do paciente

deixando-o mais propício a contrair infecções(FREIFELD et al., 2011; HUGHES et al., 2002).

Quadro 1 - Fatores de Predisposição à Infecção em Pacientes com Câncer	
Fatores do Hospedeiro	Fatores Associados ao Tratamento
Barreiras anatômicas interrompidas	Cirurgia
Imunodeficiências humorais	Terapia de radiação
Imunodeficiências mediadas por células	Quimioterapia
Disfunção orgânica	Modificadores da resposta biológica
Doenças concomitantes e infecções passadas	Uso de antimicrobianos
Estado nutricional	Procedimentos de diagnósticos invasivos
O estresse psicológico	Cateteres venosos centrais
	Cateteres urinários
	Transfusões de sangue
	Traqueostomia

Fonte:(ZEMBOWER, 2014) Adaptado.

A infecção por bactérias pode ser a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer que se apresentam neutropênicos, (WHITE; YBARRA, 2014). Até 25% dos pacientes com neutropenia profunda desenvolvem infiltrados pulmonares e não respondem a terapia antibacteriana de amplo espectro, (MASCHMEYER et al., 2015). A febre na fixação da neutropenia pode ser um indicativo de infecção, e a demora no diagnóstico normalmente leva a um desfecho fatal, (HUGHES et al., 2002). Devido a isso, a neutropenia febril requer avaliação de risco imediata, tratamento com antibióticos empíricos de amplo espectro e o uso profilático de fatores de crescimento mielóides quando indicado (LYMAN et al., 2011).

Devido a estes tipos de infecções os pacientes já debilitados podem ser expostos a tratamentos com antibióticos convencionais os quais muitas vezes não se mostram eficazes, levando assim a utilização de antibióticos tais como carbapenems e fluoroquinolonas, os quais têm sido ligados ao aparecimento de

bactérias multi-resistentes, em pacientes com câncer (MARTINO et al., 1998; ROLSTON, 2009; WOODFORD; LIVERMORE, 2009). Segundo levantamento feito por (ZEMBOWER, 2014), no Quadro 2 estão citadas as principais bactérias relacionadas com os tipos de cânceres e imunodeficiências.

Quadro 2 - Infecções Relacionadas a Doenças Subjacentes.		
Malignidade	Imunodeficiência	Bactérias comuns
Leucemia Aguda Linfoma	Neutropênicos.	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , estreptococos, enterococos. <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp, <i>P. aeruginosa</i>
	Mediada por células; não neutropênicos.	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp, <i>N. asteroides</i> , micobactérias, <i>L. pneumophila</i>
Crônica Linfocítica Leucemia	Hipogamaglobulemia.	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i>
Mieloma múltiplo	Humoral; deficiência complementar; neutropenia em estágio final.	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. meningitidis</i> e patógenos associados a neutropenia citados acima
Células pilosas Leucemia	Mediada por células, neutropenia.	<i>Salmonella</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. chelonae</i>
Tumores sólidos	Rompimento de barreiras anatômicas.	Pele: estafilococos, estreptococos. Cavidade orofaríngea: bactérias anaeróbias estreptococos, <i>H. influenzae</i> . Trato gastro intestinal: Enterobacteriaceae. Trato genital feminino: Enterobacteriaceae, bactérias anaeróbias Gram-negativas, enterococos, <i>Clostridium</i> spp.

Fonte: (ZEMBOWER, 2014) Adaptado.

Infecções por bactérias Gram-negativas são comumente encontradas em pacientes com câncer durante o tratamento com quimioterápicos. Nos últimos anos houve um aumento relativo da resistência bacteriana destas bactérias em infecções nosocomiais. *E. coli* vem se mostrando um dos principais isolados clínicos em

pacientes no ocidente com câncer numa frequência em torno de 32,1% (FOX et al., 2010).

Os quadros de sepse em pacientes com câncer vêm sendo discutido a longa data. Observa-se em centros oncológicos o aumento do índice de mortalidade por sepse em pacientes com câncer (CHANOCK, 1993; LAGU et al., 2012; WILLIAMS et al., 2004). A imunossupressão decorrente do câncer como pelos tratamentos imunossupressores da quimioterapia podem ser fatores desencadeadores das infecções sistêmicas (CHANOCK, 1993). Essa imunossupressão afeta o comportamento do sistema imune dos pacientes com câncer diminuindo a depuração bacteriana e apoptose dos linfócitos como demonstrado em modelos de tumor e infecção (FOX et al., 2010). Outra observação relevante é que comparado aos pacientes com tumores sólidos os pacientes que apresentam malignidades sanguíneas são 15 vezes mais propensos a desenvolver o quadro de sepse grave (WILLIAMS et al., 2004).

1.3.1 Modelos de tumor e infecção

A capacidade da bactéria se multiplicar em tecidos tumorais já vem sendo observado desde décadas passadas (CUMMINS; TANGNEY, 2013). Diversos experimentos vêm demonstrando a presença de isolados bacterianos em diferentes variedades de tumores (XUAN et al., 2014) Já é sabido que pacientes com tipos de patologias malignas podem ser mais tendenciosos a infecções por bactérias oportunistas. Em experimentos animais, quando inoculado bactérias via corrente sanguínea, estas tendem a migrar para os ambientes tumorais (BONNET et al., 2014; ZAMBIRINIS et al., 2014). Devido a esta capacidade de proliferação em ambientes tumorais tem sido demonstrando que as bactérias com manipulação genética podem ser utilizadas como potenciais agentes biológicos como veículo na entrega de genes para tratamento do câncer (ROBERTS et al., 2014).

Outra vertente crescente pode ser vista como a avaliação das bactérias presentes em ambientes tumorais na eficácia do tratamento do câncer por drogas quimioterápicas. Algumas pesquisas demonstram que as bactérias presentes em tumores ou em via sistêmica de pacientes com câncer, conseguem manipular estruturalmente os agentes quimioterápicos utilizados na clínica tornando-os mais

tóxicos e ineficazes ou, aumentando até mesmo a eficácia em alguns casos, destes quimioterápicos (LEHOURITIS et al., 2015).

Os modelos de tumor associados às infecções vêm sendo utilizados para tentar sanar algumas dúvidas quanto os mecanismos que estão envolvidos no aumento da mortalidade de pacientes com câncer que podem apresentar quadro de infecções sistêmicas (sepsis). Alguns autores demonstraram através de experimentos, elevada taxa de mortalidade em animais com a inoculação de células tumorais de adenocarcinoma do pâncreas (PAN02), no dorso dos mesmos. A mortalidade significativa ocorreu após 7 dias de infecção desencadeada pela bactéria *P. aeruginosa* (séptica) inoculada via intratraqueal. Segundo Fox e colaboradores (2010), o aumento da mortalidade pode estar relacionado ao aumento da bacteremia sistêmica, alterações no epitélio intestinal e apoptose de linfócitos (FOX et al., 2010).

Em outro experimento, que também utilizou a associação do câncer e infecção sistêmica, os animais foram induzidos ao desenvolvimento do tumor com células de câncer de pulmão (LLC-1) com uma injeção na coxa dos animais e, após o crescimento tumoral, os mesmos foram submetidos à sepsis pela ligadura e perfuração do ceco. Neste trabalho Lyons e colaboradores (2016) sugerem através dos resultados obtidos, que a associação do tumor a sepsis aumentou significativamente o índice de mortalidade, como também apresentou diminuição dos linfócitos CD4⁺ e aumento na apoptose de linfócitos CD8⁺. Estes animais com tumor e infecção também apresentaram aumento no número de bactérias no peritônio (LYONS et al., 2016). Neste contexto, os modelos atuais de tumor associado ao câncer vêm sendo utilizados como ferramentas para novas descobertas tanto para a área farmacológica como para área de imunologia e microbiologia.

2 JUSTIFICATIVA

Pacientes com câncer são mais propensos às infecções bacterianas sistêmicas do que o público geral. Anualmente as infecções sistêmicas em ambientes hospitalares levam ao óbito milhares de pacientes com câncer. Visto isto, existe a procura por novos compostos eficazes contra o câncer e infecções bacterianas. Para avaliação de novos fármacos são necessários testes em modelos tanto “in vivo”. A utilização de camundongos em modelos animais de diferentes patologias tem sido uma ferramenta eficaz na descoberta de novos fármacos como também na caracterização dessas patologias, pois os camundongos apresentam em torno de 90% de compatibilidade genética com os humanos. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo padronizar um modelo animal de tumor associado à infecção. Esse modelo se apresenta como uma ferramenta biotecnológica para novas descobertas e elucidação frente as duas patologias, câncer e infecção nas diferentes áreas da saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Padronização de um modelo de tumor ascítico de Erlich (TAE) associado a infecção por *E. coli*.

3.2 Específicos

- Avaliar a cinética de crescimento tumoral, curva de sobrevida e migração de leucócitos em animais inoculados com TAE.
- Avaliar a curva de sobrevida em animais em modelo de infecção sistêmica induzida por *E. coli*.
- Avaliar a curva de sobrevida em animais inoculados com TAE e induzidos a infecção sistêmica por *E. coli*.
- Avaliar a carga bacteriana presente no sangue, lavado e pulmão para análise da evolução da infecção por *E. coli* em animais com TAE.
- Avaliar a resposta inflamatória através do número de leucócitos presentes no líquido ascítico após infecção sistêmica induzida por *E. coli* em animais com TAE.
- Avaliar o infiltrado de neutrófilos no pulmão por meio da detecção da enzima Mieloperoxidase (MPO) de animais com TAE induzidos a infecção sistêmica por *E. coli*.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais experimentais

Para execução dos procedimentos experimentais foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C entre 06 a 08 semanas, provenientes do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) e Biotério da USP Ribeirão Preto (Autorização do comitê de ética CEUA: 022/2015). Os animais foram mantidos em temperatura constante (23°C) em um ciclo claro/escuro, com livre acesso à ração e água. Em todos os experimentos utilizou-se o número amostral de 5 animais por grupo. A eutanásia dos animais experimentais nos procedimentos foi feita por aprofundamento em anestesia (Cetamina 150 mg.kg⁻¹ e Xilazina 15 mg.kg⁻¹).

4.2 Protocolo experimental

O desenho experimental se deu em três etapas: 1. Padronização do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), 2. Padronização da infecção sistêmica por *E. coli*, 3. Padronização do tumor associado a infecção (Figura 5).

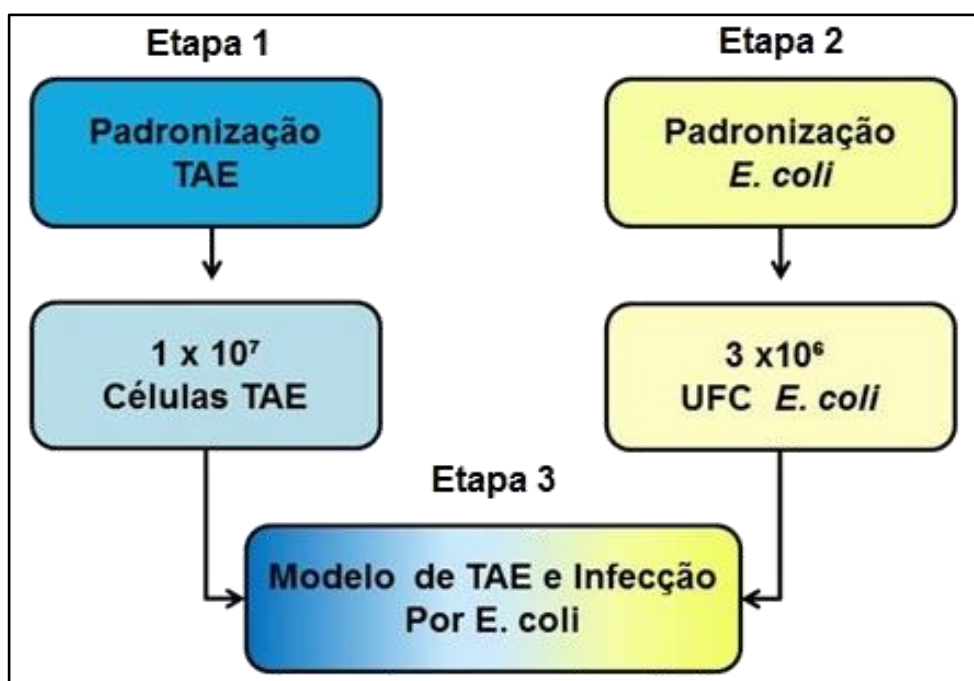


Figura 5. Etapas da padronização do modelo de TAE associado a infecção sistêmica por *E. coli*.

ETAPA 1. Na padronização do TAE foram feitas diversas avaliações, cinética de crescimento tumoral, viabilidade celular, análise da migração de leucócitos, peso, volume e número de células TAE. Com estes dados foi determinado o número de células tumorais que iriam compor o modelo sugerido.

ETAPA 2. Na infecção sistêmica por *E. coli* determinou-se o número de UFC necessário para composição do modelo proposto. Foram feitos os seguintes testes: curva de crescimento bacteriano, determinação do inóculo e sobrevida dos animais com diferentes cargas bacterianas.

ETAPA 3. Na caracterização e padronização do modelo de TAE associado à infecção sistêmica por *E. coli*, foi feita a avaliação da sobrevida dos animais com diferentes números de UFC, com o intuito de ajustar a melhor carga bacteriana em conjunto com o tumor. Após a sobrevida o melhor número de carga bacteriana foi associado novamente ao tumor, caracterizando-o com diferentes tipos de análises: peso e volume tumorais, número de células tumorais, viabilidade celular, infiltrado leucocitário recuperações bacterianas do sangue, do lavado peritoneal e do pulmão, dosagem de MPO do pulmão e permeabilidade vascular.

4.3 Manutenção das células tumorais de Ehrlich

A manutenção das células tumorais foi executada conforme descrito por (CALIXTO-CAMPOS et al., 2013) com modificações. Resumidamente as células tumorais foram avaliadas quanto à viabilidade celular determinada pelo método de exclusão utilizando azul de Tripán (0,5%) em câmara de Neubauer. As células tumorais foram inoculadas intraperitonealmente (i.p) numa concentração de 1×10^7 em dois animais recipientes. Após 7 dias da indução do tumor o líquido ascítico foi coletado por punção intraperitoneal o *pellet* foi suspenso em solução fisiológica e inoculado em outros animais. Esse procedimento foi executado semanalmente até o término experimental.

4.4 Cinética de crescimento tumoral

Baseando-se na literatura (VINCENT; NICHOLLS, 1967) a quantidade de células tumorais usadas respectivamente para indução do TAE foi 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 diluídas em solução salina 0,9% estéril.

Todos os animais receberam 200 µL do inóculo contendo células tumorais em diferentes concentrações por via intraperitoneal. A partir do inóculo das células tumorais os animais foram monitorados quanto à sobrevivência e o peso para a caracterização do crescimento tumoral. Ao final do experimento no 7º dia os animais foram pesados (Figura Apêndice 1A). Injetou-se 3 mL de solução salina na cavidade peritoneal e o líquido foi coletado por punção intraperitoneal, sendo este armazenado em tubo graduado. Logo após foi realizada a pesagem da carcaça dos animais para determinação do peso do tumor, o qual foi expresso em gramas sob a seguinte fórmula ($pf - pc = pt$), sendo (pf) peso final do camundongo, (pc) peso da carcaça após coleta, e (pt) peso do tumor. A determinação do volume do tumor foi feita a partir do volume do *pellet* observado em tubo graduado.

4.5 Diferenciação celular do lavado peritoneal

Posteriormente à eutanásia dos animais, as cavidades peritoneais dos mesmos foram lavadas com 3mL de salina/EDTA. O lavado peritoneal foi centrifugado separando-se *pellet* e sobrenadante para análise posteriores. O *pellet* foi usado para contagem total em câmara de Neubauer, avaliação da viabilidade com azul de Tripán. Posteriormente foram preparadas lâminas para diferenciação celular, coradas com panótico rápido, sendo em seguida analisadas em microscópio óptico, com objetiva de 100x. Foram diferenciadas as células tumorais dos seguintes leucócitos: neutrófilos, basófilos, macrófagos e eosinófilos (FERRÁNDIZ; ALCARAZ, 1991). Os valores celulares foram expressos como número de células x 10⁷ por mililitro.

4.6 Modelo de infecção sistêmica induzida por *E. coli*

Para determinação de unidades formadoras de colônias (UFC). mL⁻¹, anteriormente avaliou o crescimento bacteriano de *E. coli* (Figura Apêndice B1). Uma colônia da cepa bacteriana *E. coli* ATCC 25922, previamente crescida *overnight* em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) foi inoculada em 5 mL de meio MH (*Mueller Hinton*) caldo, e levadas ao *shaker* com temperatura e rotação controladas (37 °C, 200 rpm), por 18 h. Após este período 200 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em 10 mL de meio MH caldo novo e levada ao *shaker* (37 °C, 200 rpm) por um intervalo de 1 h

e 20 min, após este intervalo foram feitas leituras em espectrofotômetro a 600nm a cada 30 min até se obter uma densidade óptica(O.D) $\sim 1,0$ em absorbância de 600nm. Ao atingir essa densidade óptica as suspensões bacterianas foram diluídas em série e semeadas pelo método de micro gotas em placas de Petri contendo meio MH ágar. As placas foram incubadas em uma estufa a 37 °C por 18 h. Logo após as colônias bacterianas crescidas nas placas foram contadas em contador automático de UFC para determinação do número de UFC.mL⁻¹ na O.D $\sim 1,0$. Foram feitas triplicatas biológicas e técnicas (Tabela Apêndice B1).

O inóculo bacteriano foi preparado imediatamente antes da inoculação, e ressuspenso em 10mL de solução salina estéril 0,9%. Ao final o *pellet* foi eluído e os volumes foram ajustados para as cargas bacterianas, $\sim 1 \times 10^8$, 3×10^6 e 7×10^5 UFC. Todos os procedimentos foram feitos em condições estéreis e com as bactérias mantidas em gelo até o momento da inoculação (Tabela Apêndice B2).

Os animais receberam intraperitonealmente 200 μ l do inóculo bacteriano exceto grupo controle que só recebeu solução fisiológica no mesmo volume. Todos os animais foram monitorados durante sete dias ou até a sua morte, para determinação da taxa de mortalidade (SILVA et al., 2016).

4.7 Modelo de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) associado à infecção sistêmica por *E. coli*

4.7.1 Curva de sobrevida

Os animais receberam intraperitonealmente o tumor ascítico de Ehrlich (TAE) na concentração de 1×10^7 células como descrito anteriormente no experimento de dinâmica de crescimento tumoral. Após 7 dias esses animais foram infectados por inóculo bacteriano de *E. coli* 3×10^6 UFC , previamente preparados como descrito anteriormente no modelo de infecção sistêmica induzida por *E. coli*. Como controles, animais foram inoculados apenas com o TAE e desafiados com solução salina 0,9%, e sem TAE apenas induzidos com solução salina 0,9% e infectados por *E. coli*. Foi feito o acompanhamento dos animais por 7 dias ou até a morte para definição da taxa de mortalidade (Tabela Apêndice C1 e Figura Apêndice C1).

4.7.2 Quantificação bacteriana no sangue, pulmão e líquido ascítico

A quantificação bacteriana foi avaliada como descrito por (SILVA et al., 2016) resumidamente, os camundongos com tumor ascítico de Ehrlich e induzidos a infecção sistêmica por *E. coli* foram sacrificados 6 horas após a indução da infecção sistêmica. O sangue foi coletado por punção cardíaca e o peritônio foi lavado com 3,0 mL de solução salina estéril e também coletado. Alíquotas foram diluídas em série, e semeadas em micro gotas em meio ágar Muller-hinton (Difco). Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24h a 37°C e o número de UFC foi expresso como Log₁₀ UFC por mililitro da amostra. Quanto ao sangue este foi coletado por punção cardíaca, diluído e semeado seguindo o protocolo usado acima. Já o pulmão foi removido cirurgicamente e um lóbulo foi pesado, triturado e diluído em série como descrito acima, o número de UFC foi expresso como Log₁₀ UFC por grama de tecido.

4.7.3 Determinação do infiltrado de neutrófilos nos pulmões através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

A intensidade do acúmulo de neutrófilos nos pulmões de animais inoculados com tumor de Ehrlich e induzidos a Infecção sistêmica por *E. coli* foi aferida pelo ensaio da mieloperoxidase (SOUZA et al., 2001). Para tanto, apenas um lóbulo dos pulmões foi colocados em 200µL de tampão NaCl a 0,1M; NaPO₄ a 0,02M e NaEDTA a 0,012M gelado (pH 4,7) este foi triturado com auxílio de uma tesoura. O homogeinato foi em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado então um choque hipotônico no “*pellet*” de células com 600 µl de NaCl a 0,2%, seguido por 600 µl de uma solução de NaCl a 1,6% e glicose a 5%. Depois de nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “*pellet*” foi ressuspenso em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir esse homogeneizado foi congelado e descongelado três vezes em nitrogênio líquido e novamente centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 30µL do sobrenadante das amostras de pulmões foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionadas 25µL de TMB (“3, 3’, 3, 3’-tetramethylbenzidine” – 1,6 mM final na placa) e a placa foi incubada por 5min. Logo após, 100 µL de H₂O₂ (0,5 M final na

placa) foram adicionados nos poços e a placa foi incubada por mais 5 min. A seguir a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal de camundongos) após 6h do estímulo com carragenina, os quais foram diluídos em série em NaPO₄ a 0,08M (1×10^5 neutrófilos/ poço/ 50μL). Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA (Spectra Max 250; Molecular Devices) no comprimento de onda de 450nm. Resultados expressos como número de neutrófilos por 0,1g de tecido.

4.7.4 Permeabilidade vascular

Para avaliação da permeabilidade vascular, utilizou-se o corante azul de Evans por via intravenosa. Após 7 dias de inoculação do TAE (1×10^7), os animais receberam uma carga bacteriana intraperitoneal de 3×10^6 de *E. coli*. Após 1 hora os animais foram anestesiados, para a inoculação intravenosa no plexo orbital do corante azul de Evans (20mg.kg⁻¹). Após 6h dada à inoculação das bactérias os animais foram eutanasiados e o peritônio dos animais foi lavado com uma solução fisiológica 0,9% (3mL por cavidade). O lavado peritoneal foi então centrifugado e o sobrenadante foi semeado (200μL. poço⁻¹) para avaliação em ELISA a uma absorbância de 650nm (Figura Apêndice D1). Foram feitas triplicatas técnicas de cada animal (CORVALÁN, 1994). Os resultados foram expressos como quantidade do corante azul de Evans μM. mL⁻¹, baseando-se numa curva padrão por regressão linear já conhecida do corante (100 μM- 0,001 μM).

4.8 Análise estatística

Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa “GraphPad prism versão 6.01”. Nos casos de diferentes tratamentos, o teste de análise de variância (Céspedes *et al.*) foi utilizado para comparar as diferenças entre eles, podendo ter um fator ou dois fatores. Em todos os casos, comparações individuais foram testadas com teste t de *Bonferroni* (comparações múltiplas). O número (n) de animais por grupo experimental está descrito nas figuras. Os resultados foram expressos como média ± EPM e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p < 0,05$.

As curvas de sobrevida foram expressas como percentagem de camundongos vivos observados em um intervalo de 24h durante os 7 dias avaliados*. Para a análise estatística das curvas de sobrevida foi utilizado o teste Mantel-Cox logrank (X^2 “*chi-squared*”), e as diferenças foram consideradas estatisticamente diferentes a partir de $P < 0,05$.

$$\text{* \% de sobrevida} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de animais vivos até o intervalo de tempo avaliado}}{\text{n}^{\circ} \text{ de animais no início do experimento}} \times 100$$

5 RESULTADOS

5.1 Cinética de desenvolvimento do TAE em camundongos Balb-C

Os experimentos iniciais foram conduzidos com intuito de avaliar a cinética do crescimento do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) em camundongos Balb-C e deste modo definir número de células tumorais a serem utilizadas no modelo proposto. A partir de dados da literatura foram definidos três números de células tumorais (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7) para inoculação nos animais, objetivando obter desenvolvimento do tumor em sete dias, porém sem que houvesse óbito dos animais ou sinais de sofrimento, caracterizado por Fernandes, 2015. Nossos resultados demonstram que o ganho de peso dos animais após a injeção de 1×10^7 células do TAE foi de cerca de 20% ($p < 0,001^{***}$) após sete dias em relação ao peso inicial. As injeções de 1×10^5 e 1×10^6 células do TAE não foi capaz de induzir aumento ponderal de modo significativo até o sétimo dia de observação (Figura 6A). No período avaliado não foram registrados óbitos de animais em todos os inóculos de TAE utilizados.

Corroborando aos resultados anteriores de que 1×10^7 células do TAE é capaz de induzir o desenvolvimento tumoral com sucesso, foi avaliada a razão entre o peso final dos animais após sete dias e o peso da carcaça após a coleta do líquido ascítico, para representar o peso referente ao tumor especificamente. Foi observado que os camundongos que receberam a maior inóculo tumoral (1×10^7) apresentaram massa tumoral 86% e 71% maior ($p < 0,001^{***}$) quando comparado aos grupos que receberam 1×10^5 e 1×10^6 células respectivamente (Figura 6B). Os grupos inoculados com 1×10^5 e 1×10^6 células não apresentaram diferenças no peso tumoral entre si. Do mesmo modo, quando avaliamos o volume do tumor, nossos resultados demonstraram que no grupo que recebeu 1×10^7 de células TAE, o volume do tumor foi cerca de 64% e 34% maior em relação aos o grupos inoculados com 1×10^5 e 1×10^6 células respectivamente (Figura 6C). Esses dados em conjunto indicam que a injeção intraperitoneal de 1×10^7 de células do TAE é capaz de induzir expressivo desenvolvimento tumoral após sete dias.

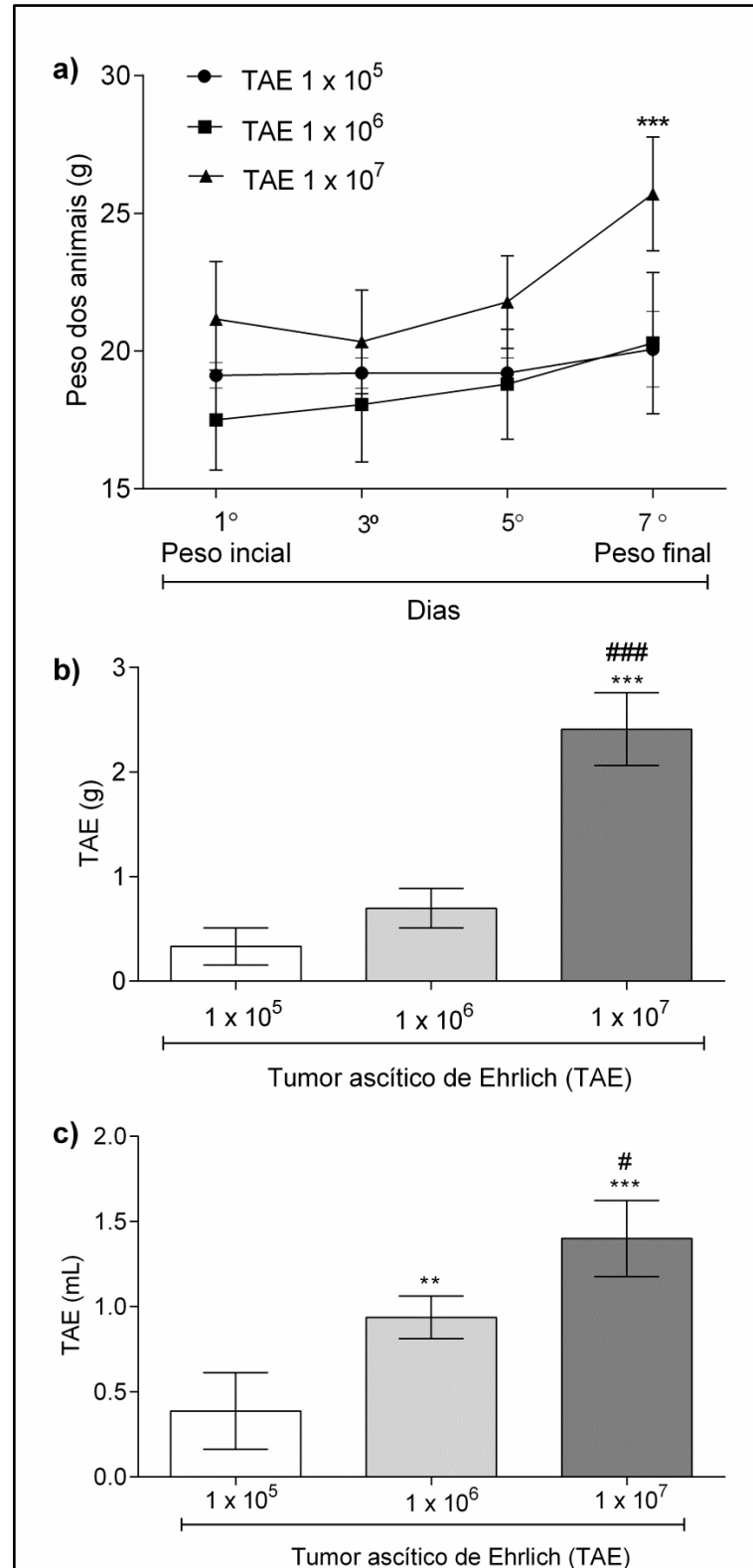


Figura 6. Cinética de crescimento tumoral em camundongos Balb/C (n=5), após indução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) com diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7) num período de sete dias. **a)** Ganho de peso corporal de animais. **b)** Peso em gramas do TAE (peso final – peso da carcaça). **c)** Volume do tumor após a centrifugação. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ significância quando comparado ao grupo 1×10^5 . ### $p < 0,00$, # $p < 0,05$ significância quando comparado ao grupo 1×10^6 .

Visto que a progressão do TAE induz ao acúmulo de líquido ascítico e fibrina na cavidade peritoneal de camundongos, foi avaliado o número de células contidas no tumor. O número de células do grupo que recebeu o inóculo 1×10^7 foi significativamente maior (35 e 65% respectivamente; $p < 0,01^{**}$) quando comparado aos grupos que receberam 1×10^5 e 1×10^6 células (Figura 7A). Quanto à viabilidade celular esta se manteve na ordem de 90% e foi similar para todos os grupos analisados (Figura 7B). Na (Figura 7C) pode ser observada as características morfológicas de TAE.

Uma vez que o desenvolvimento do TAE é capaz de estimular a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos verificamos que 1×10^7 apresentou uma migração maior ($*p < 0,05$) que os animais que receberam o inóculo 1×10^5 sete dias de indução do tumor (Figura 8A). Na Figura 8B está demonstrado que os leucócitos predominantes foram os macrófagos e eosinófilos

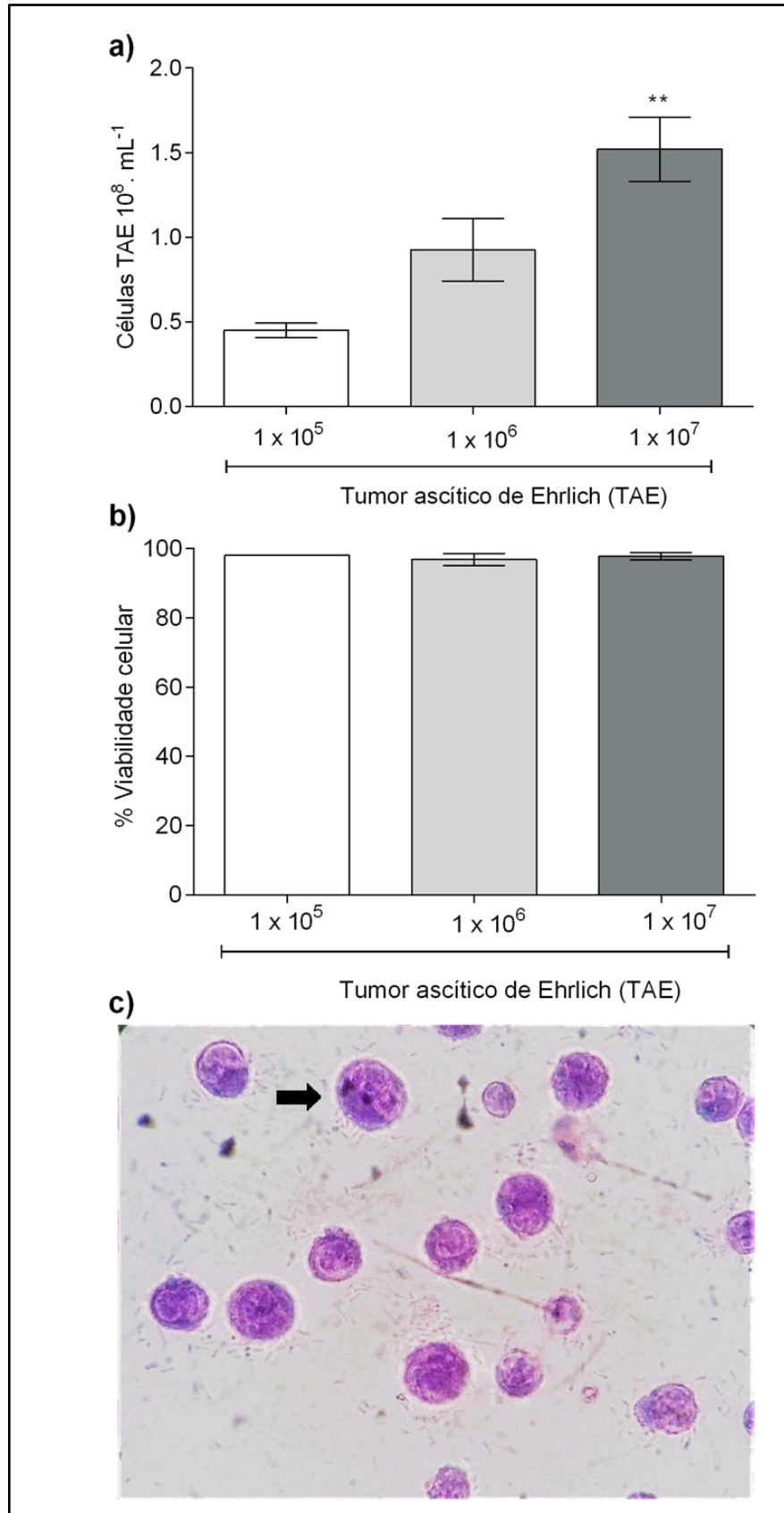


Figura 7: Avaliação celular no líquido ascítico de Ehrlich coletado no sétimo dia após indução tumoral (TAE) em diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7). **a)** Número de células TAE. **b)** Viabilidade celular do TAE. **c)** Células TAE 1×10^5 aumento 100x. **p < 0,01 significância quando comparado ao grupo 1×10^5 .

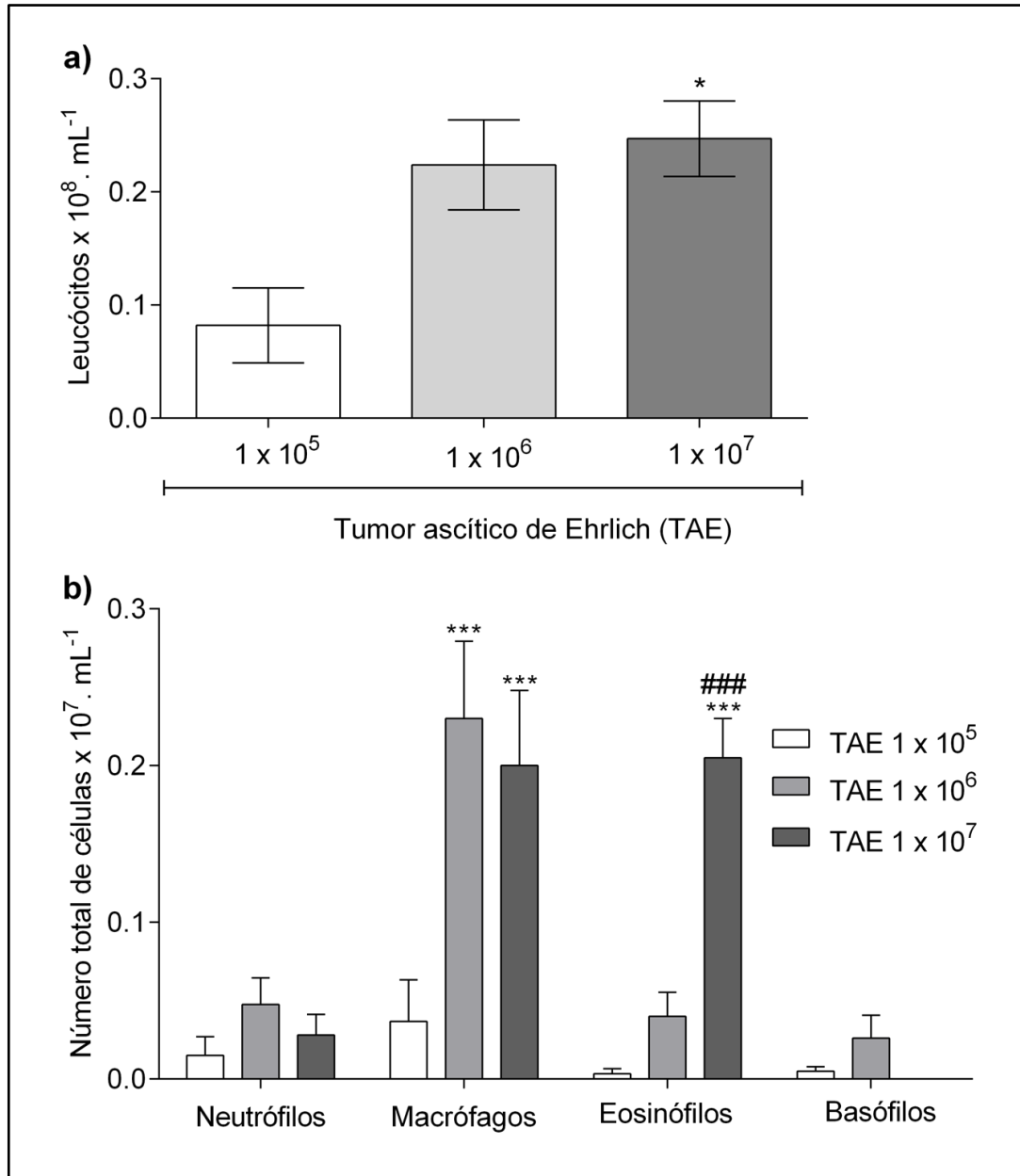


Figure 8. Análise do infiltrado leucocitário e células tumorais peritoneal de camundongos (n=5) Balb/C após sete dias da à indução do TAE em diferentes concentrações (1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7). **a)** Leucócitos totais coletados a partir da lavagem peritoneal, contagem diferencial em microscópio óptico objetiva de 100 x, diferenciação celular feita em 100 células. **b)** Número de neutrófilos presentes na cavidade peritoneal. ***p<0,001 significância quando comparado ao grupo 1×10^5 . ###p<0,001 significância quando comparado ao grupo 1×10^6 .

5.2 Caracterização da infecção por *E. coli* em camundongos Balb-C

Para a padronização da infecção sistêmica por *Escherichia coli* para nosso modelo experimental, inicialmente foi determinada a carga bacteriana capaz de induzir 40% a 0% de sobrevida até do sétimo dia. Foram avaliados inóculos bacterianos contendo 1×10^8 , 3×10^6 e 7×10^5 UFC. Na curva de sobrevida foi possível observar que 24h após a inoculação da *E. coli*, os animais que receberam 3×10^6 e 1×10^8 UFC apresentaram 20% de sobrevida comparado ao grupo controle que recebeu somente salina 0,9%. Já os animais que receberam 7×10^5 UFC apresentaram 100% de sobrevida. A partir dessas observações, os próximos experimentos foram conduzidos com a inoculação de 3×10^6 UFC de *E. coli* (Figura9).

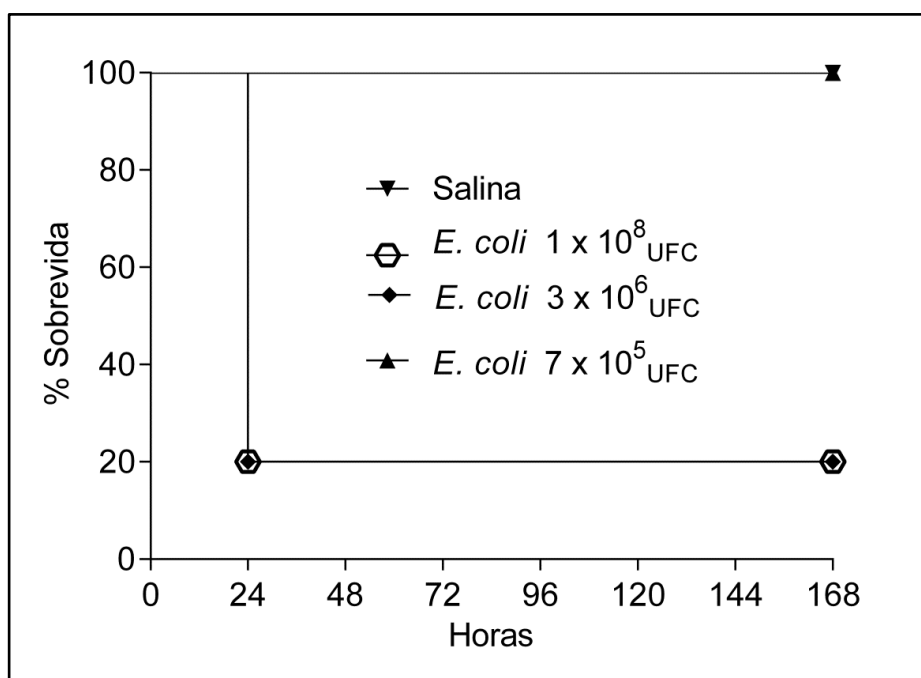


Figure 9. Curva de sobrevida de camundongos Balb/C (n=5) desafiados com diferentes inóculos de *E. coli* ATCC 25922 (1×10^8 , 3×10^6 e 7×10^5) avaliados por 168 horas totalizando 7 dias.

5.3 Caracterização do modelo de TAE e *E. coli* em camundongos Balb-C

A (Figura 10) representa a curva de sobrevivência de camundongos inoculados com TAE (1×10^7) e após sete dias desafiados com *E. coli* (3×10^6 UFC). Os dados demonstram taxa de sobrevivência de 40% no grupo no qual os animais receberam apenas o inóculo bacteriano, já aqueles que receberam as células TAE e posteriormente as bactérias houve diminuição da taxa de sobrevivência, que atingiu 0% de sobrevivência no quinto dia de observação. Os animais que receberam apenas as células do TAE apresentaram 100% de sobrevivência até o final experimental.

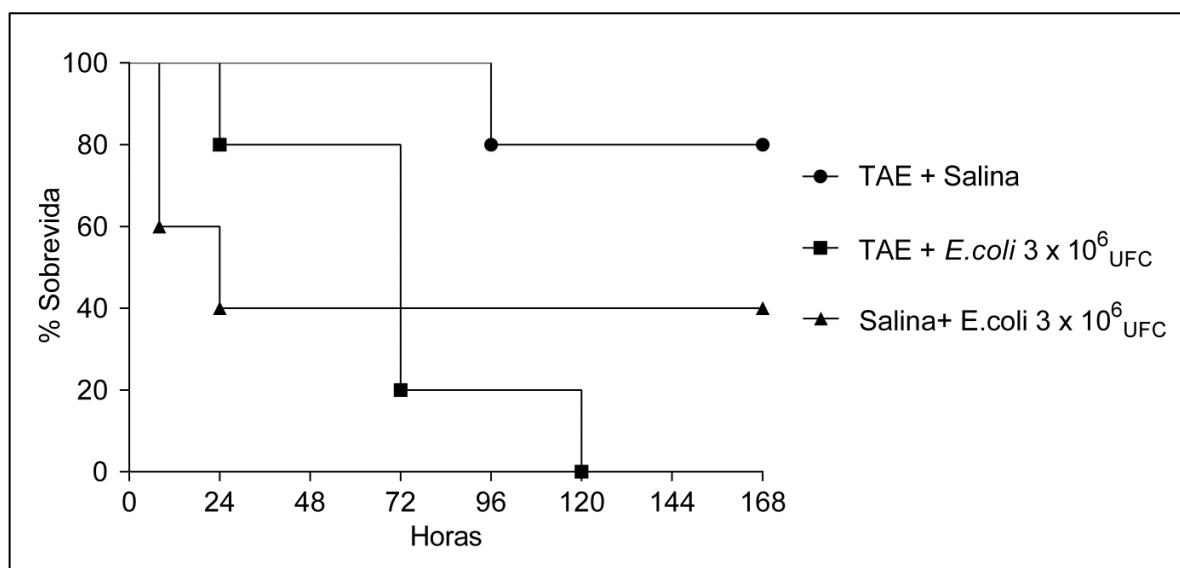


Figura 10: Curva de sobrevivência em camundongos Balb/C ($n=5$) em modelo de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) 1×10^7 associado à infecção por *E. coli*. Os animais receberam o tumor de Ehrlich (i.p) ou salina 0,9% estéril (i.p). No sétimo dia da indução do tumor e inóculo com salina os animais foram infectados com diferentes inóculos (1×10^7 , 3×10^6 e 1×10^6 UFC) de *E. coli* ATCC 25922. Um grupo de animal com TAE recebeu apenas salina 0,9%. Os animais foram monitorados diariamente por 168 horas, 7 dias.

Para avaliação do modelo do tumor de ascítico Ehrlich associado à infecção por *E. coli* os mesmos parâmetros usados para avaliação do crescimento tumoral empregados anteriormente foram utilizados. Nossos dados demonstram que tanto os animais inoculados apenas com o TAE bem como aqueles que receberam também o inóculo bacteriano apresentaram crescimento do tumor evidenciado pelo aumento ponderal de cerca de 10% no sétimo dia quando ao peso inicial. Entretanto

a associação da *E. coli* não foi capaz de modificar o crescimento tumoral, uma vez que não houve diferença no peso dos animais que receberam o TAE ou TAE associado a *E. coli*. Esse aumento ponderal também foi significativo quando comparado aos animais que receberam salina ou apenas *E. coli* sem o TAE (Figura 11). Do mesmo modo, tanto os animais que receberam o TAE como grupo co-infectado com TAE e *E. coli* apresentaram crescimento da massa tumoral e número de células similares (Figura 12A e B) quanto ao volume do tumor (Figura 12C) este também não mostrou diferença nos grupos em que foi induzido o tumor. Nossos resultados sugerem que a infecção por *E. coli* não foi capaz de alterar a progressão do crescimento tumoral.

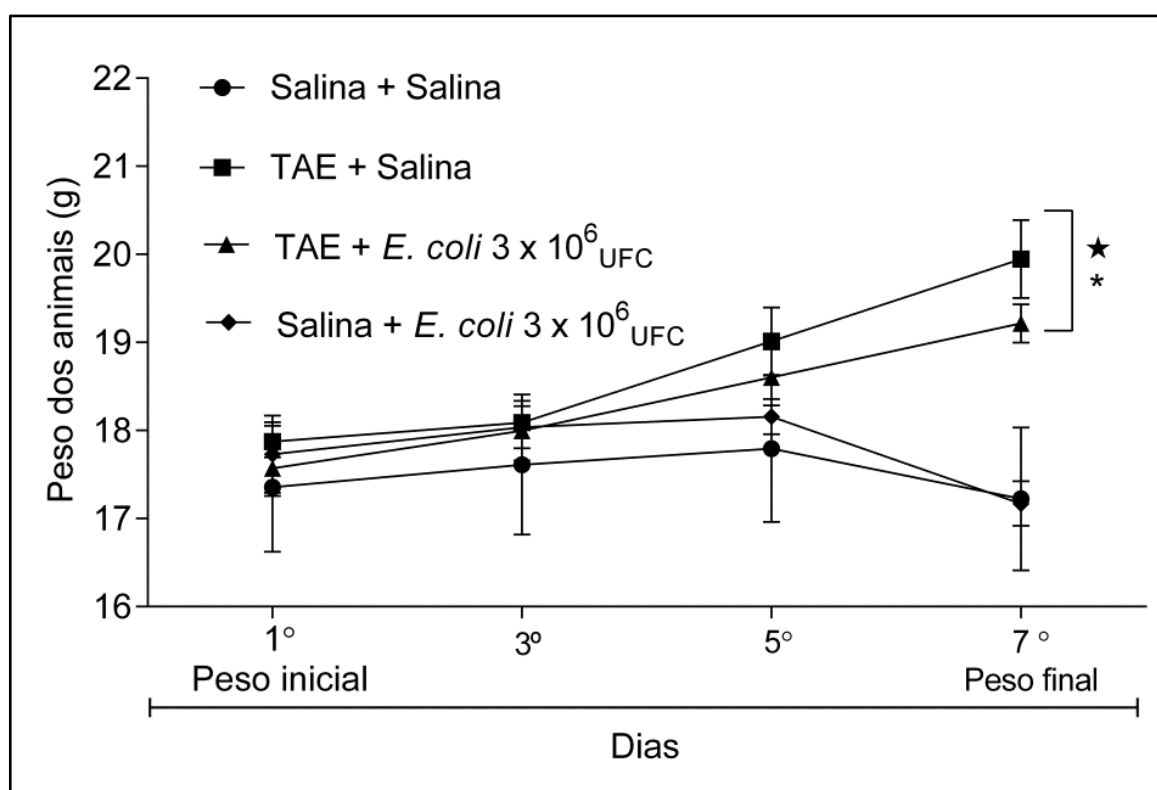


Figure 11. Cinética de crescimento tumoral do modelo de TAE associado a infecção sistêmica por *E. coli*. Ganho de massa corporal dos animais no intervalo de sete dias. * $p < 0,05$ significância Salina + Salina. * $p < 0,05$ significância Salina + *E. coli*.

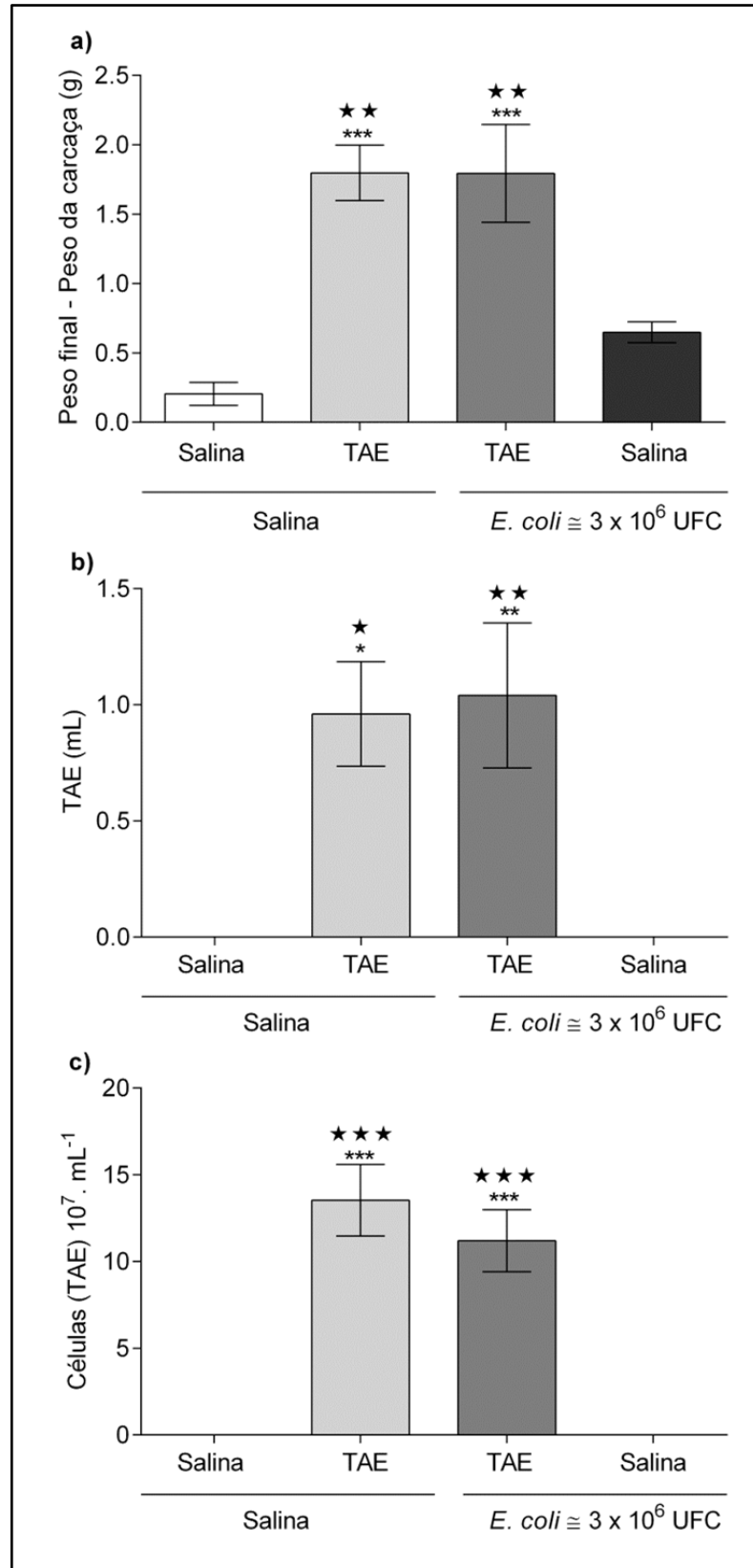


Figura 12. Caracterização tumoral do modelo de TAE associado à infecção sistêmica por *E. coli*. **a)** Peso final - peso da carcaça para estimar em gramas o peso do tumor ao final de sete dias. **b)** Volume TAE após centrifugação **c)** Número de células tumorais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significância Salina+ Salina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ significância Salina+ *E. coli*.

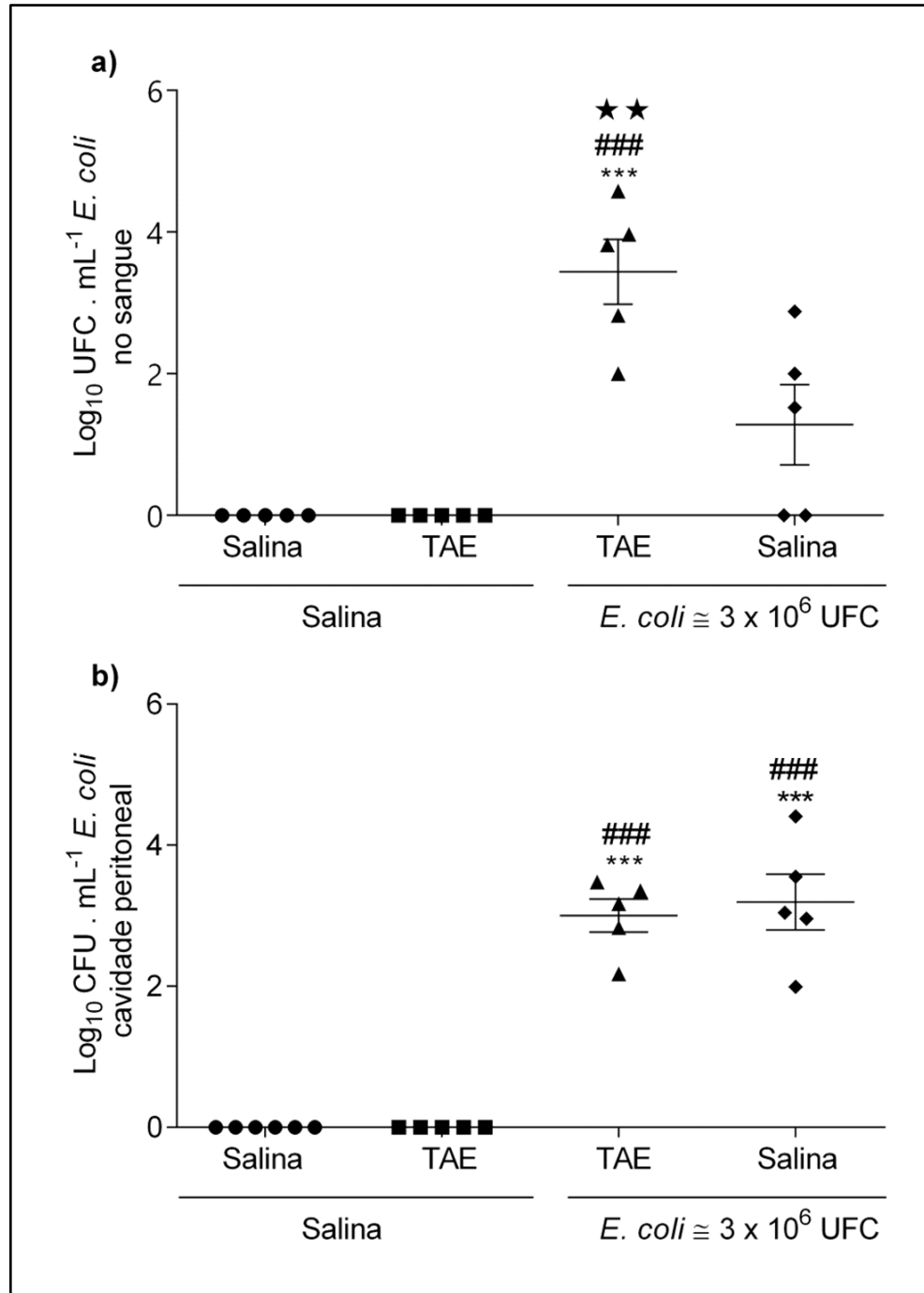


Figura 13. Recuperação bacteriana do sangue e do lavado peritoneal de animais (n=5) em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. Seis horas após o inóculo da bactéria foi realizada a coleta do sangue total por punção cardíaca e coletado o lavado. Estes foram diluídos e semeados em micro gotas. Realizou-se a contagem do número de unidade formadora de colônias (UFC). Os resultados foram expressas com a escala $\text{Log}_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$. **a)** UFC de *E. coli* no sangue. **b)** UFC de *E. coli* lavado. Foram feitas triplicatas técnicas. *** $p < 0,001$ significância Salina+ Salina. ### $p < 0,001$ significância TAE+ *E. coli*. ** $p < 0,01$ significância salina + *E. coli*.

Posteriormente foi investigado o comportamento da infecção na presença ou ausência do TAE por meio da determinação de UFC no lavado peritoneal e no sangue (Figura 13). Nossos resultados demonstram que não houve diferença estatística no número de bactérias encontradas no lavado peritoneal dos animais pré-inoculados ou não com TAE (Figura 13A). Entretanto, quando os animais foram avaliados quanto à presença de bactérias na corrente sanguínea pode-se verificar que o grupo que foi inoculado com TAE e posteriormente com *E. coli* apresentou aumento de cerca de 60% no número de UFC no sangue, quando comparado ao grupo que recebeu apenas *E. coli* (Figura 13B), indicando a disseminação da bactéria.

Quando avaliamos a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal foi possível observar que os camundongos inoculados com TAE e *E. coli* apresentaram aumento no número de leucócitos em cerca de 80% quando comparado aos animais que receberam apenas *E. coli* ou somente o TAE (Figura 14A). Nossos resultados demonstram que o tipo celular predominante no grupo inoculado com *E. coli* e TAE foram os neutrófilos, enquanto nos animais apenas com o TAE foram encontrados majoritariamente macrófagos (Figura 14B). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quando foi avaliado o número de eosinófilos e basófilos.

Visto que na co-infecção TAE e *E. coli* houve o acesso de bactérias para a corrente sanguínea, apesar do aumento da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, objetivou-se avaliar a caracterizada por infiltração de bactérias e neutrófilos nos pulmões (Figura 15A). Os resultados demonstram que a associação do TAE à *E. coli* foi capaz de induzir o aumento de cerca de 60% no número de neutrófilos no pulmão quando comparado ao grupo que recebeu apenas a bactéria ou o TAE. O aumento de neutrófilos nos pulmões pode estar associado ao deslocamento das bactérias para a corrente sanguínea e consequentemente para os pulmões. Corroborando essa hipótese, foi demonstrado que os camundongos inoculados com TAE associado a *E. coli* apresentaram aumento no número de UFC nos pulmões (56%) quando comparado ao grupo que recebeu apenas com *E. coli* (Figura 15B).

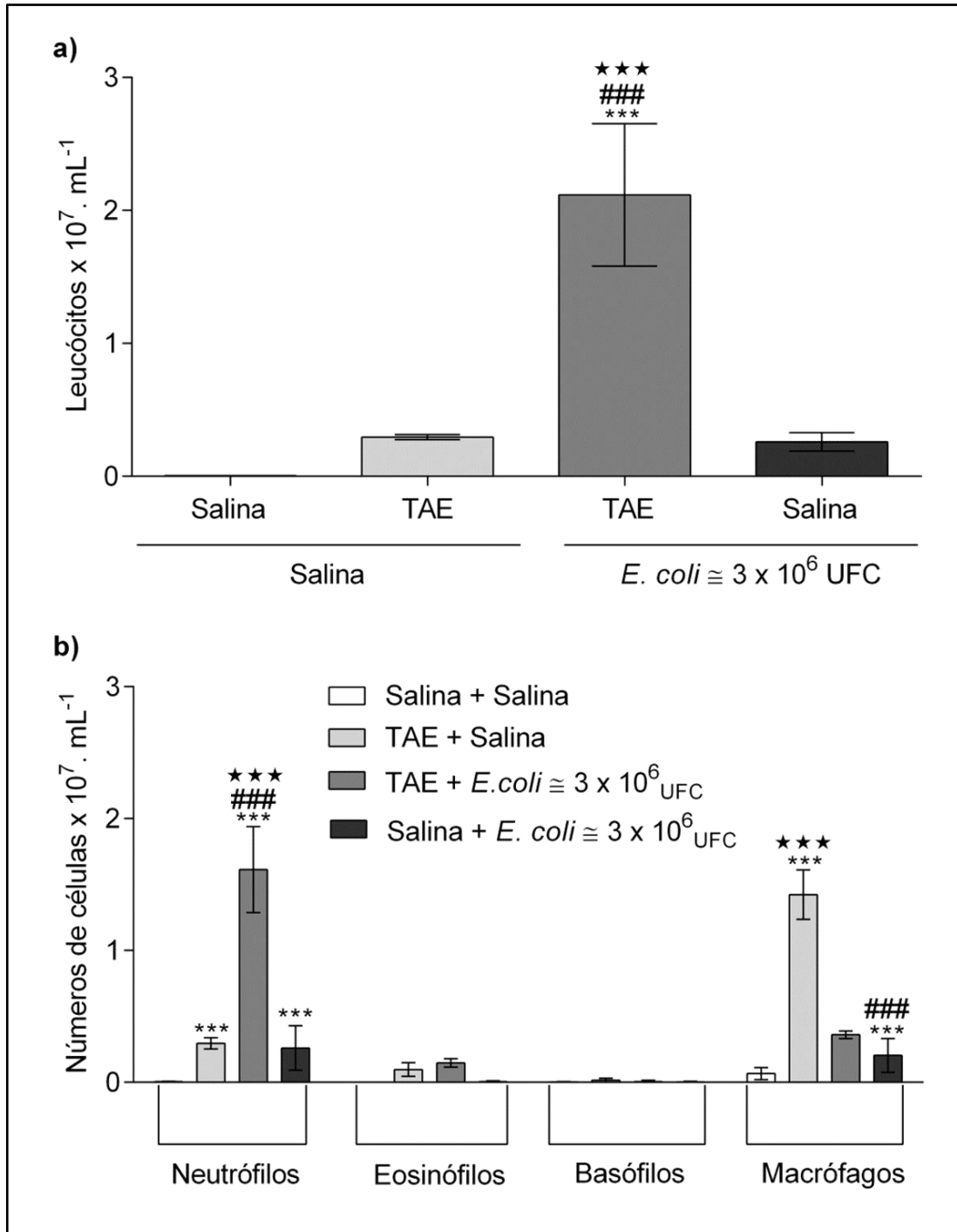


Figura 14. Análise do infiltrado leucocitário na cavidade peritoneal de camundongos (n=5) em modelo de TAE associado a infecção sistêmica por *E. coli*. **a)** Número total de leucócitos. **b)** Diferenciação da porcentagem celular dos leucócitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos e macrófagos, analisado em microscópio óptico, objetiva 100x. ***p<0,001 significância Salina+ Salina. ###p<0,001 significância TAE + Salina. ***p<0,001 significância Salina+ *E. coli*.

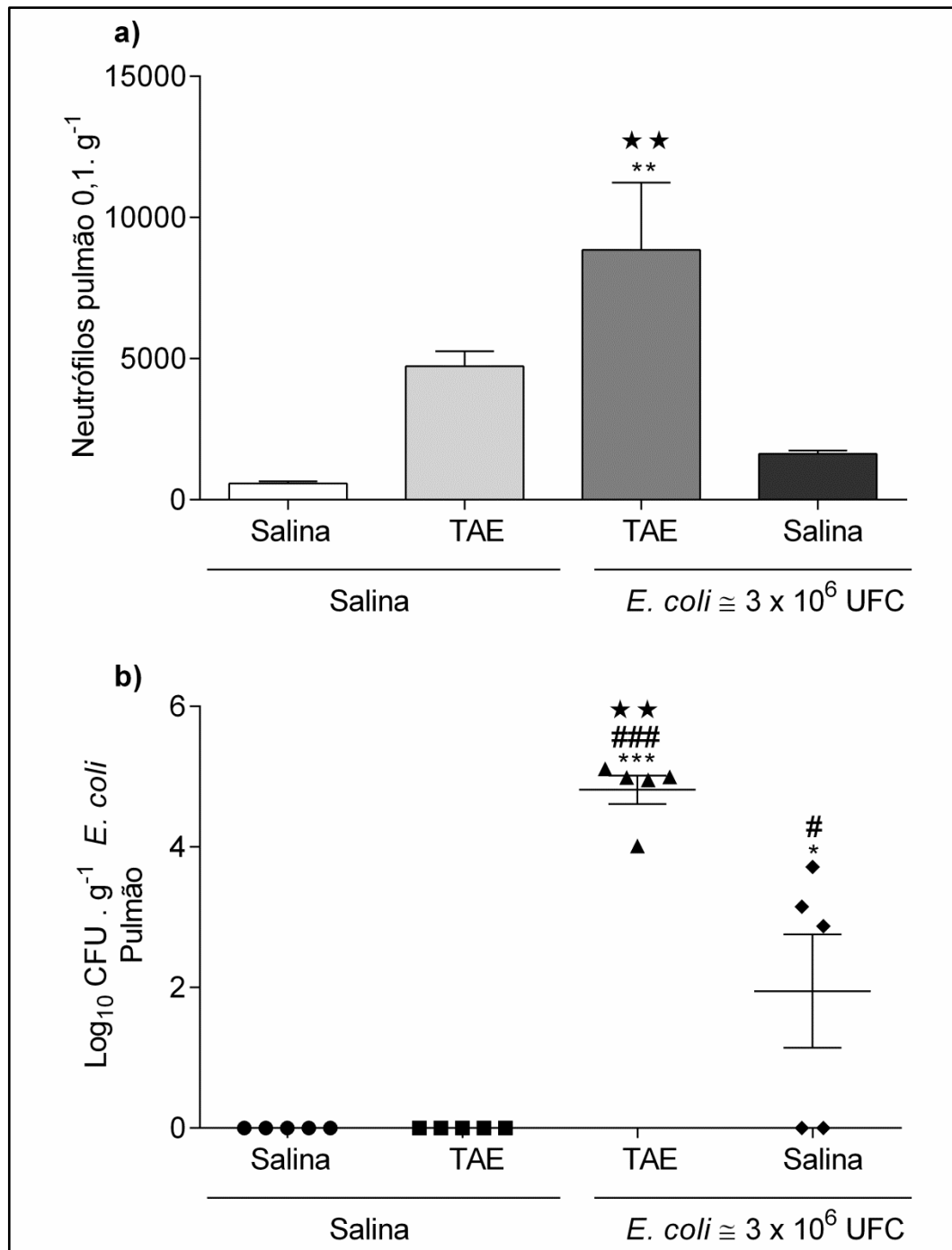


Figura 15. Dosagem de MPO e Recuperação bacteriana do pulmão de animais ($n=5$) em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. **a)** Na determinação da atividade da enzima MPO no pulmão, após os processos de lise $10\mu l$ do sobrenadante foi utilizado para dosagem da enzima. A análise da absorbância foi feita em ELISA, 450nm. Os dados foram expressos como número de neurófilo por $0,1g$ do pulmão. **b)** Na recuperação bacteriana do pulmão um lóbulo do pulmão de cada animal foi pesado e triturado em $0,8$ mL de salina estéril $0,9\%$, foi feita a diluição seriada (sem diluição, $1:10$, $1:100$, $1:1000$) e foi semeado em micro gotas em meio ágar MH. O número de unidade formadora de colônias (UFC) foi expresso com a escala \log_{10} UFC. g^{-1} de tecido. Foram feitas triplicatas técnicas. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$ significância Salina+ Salina. ### $p<0,001$, # $p<0,05$ significância TAE+ Salina.** $p<0,01$ significância Salina+ *E. coli*.

Visando elucidar o possível mecanismo envolvido na dispersão de bactérias para a corrente sanguínea, foi investigado o impacto do crescimento tumoral sobre a permeabilidade de vasos do mesentério. Os dados demonstram que o TAE é capaz de aumentar em cerca de 100% a permeabilidade vascular quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina ou *E. coli* (Figura 17).

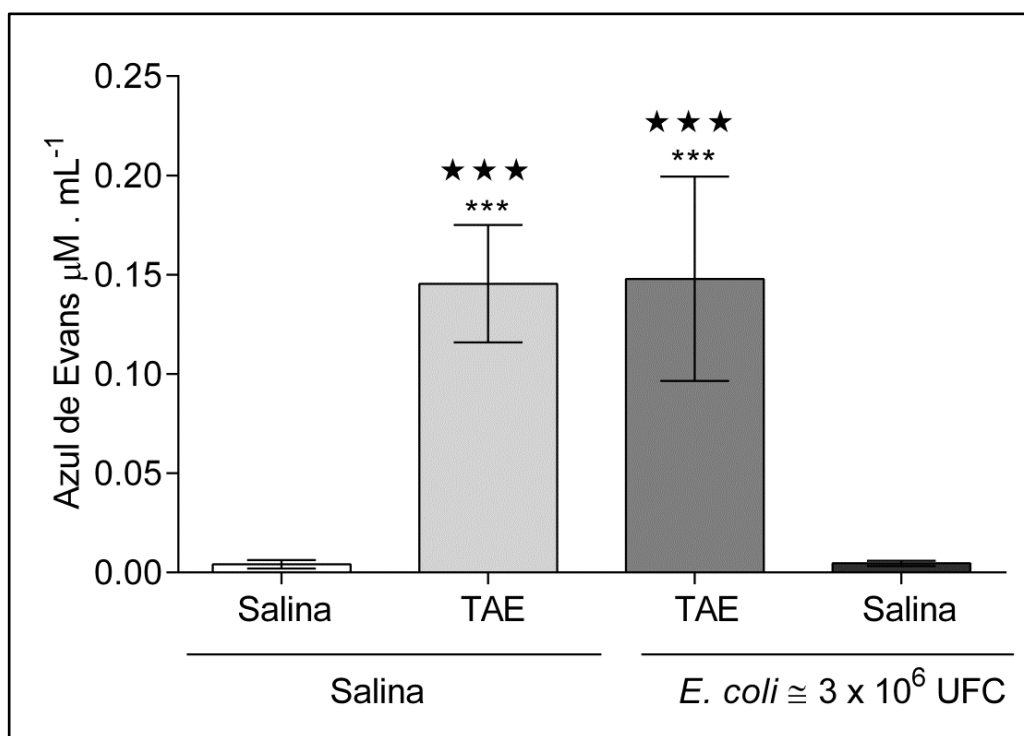


Figura 16. Avaliação da permeabilidade vascular em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. Os animais (n=5) receberam o tumor ou salina (i.p), após sete dias os animais foram infectados com *E. coli* ou receberam apenas salina, após dada 1h da infecção os animais receberam uma injeção intravenosa (plexo ocular) contendo azul de Evans 20mg/kg. Seis horas após o inóculo os animais foi realizada a coleta do líquido ascítico, injetou-se 3mL de Salina/EDTA no peritônio e por punção intraperitoneal foi realizada a coleta do líquido. O Líquido coletado foi centrifugado e foi feita a leitura do sobrenadante em ELISA a 650nm. Foram feitas triplicatas técnicas de cada animal. Os resultados foram expressos como quantidade do corante azul de Evans $\mu\text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$, baseando-se numa curva padrão já conhecida do corante (100 μM - 0,001 μM). ***P<0,001 significância a Salina+ Salina. ***p<0,001 significância a Salina+ *E. coli*.

6 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho foi possível padronizar e caracterizar um modelo de tumor associado à infecção sistêmica por *E. coli*. Inicialmente os protocolos de desenvolvimento tumoral e da infecção bacteriana foram estabelecidos isoladamente, para que posteriormente fosse realizada a co-infecção.

O tumor ascítico de Ehlich (TAE) pode ser caracterizado por aumento progressivo das células tumorais e do líquido ascítico (FERNANDES et al., 2015) acompanhado por uma resposta inflamatória local. O TAE têm-se demonstrado ao longo de décadas como um modelo animal de câncer amplamente utilizado, tanto para a caracterização da progressão tumoral (BRENNEMAN; MATHUR; SPECTOR, 1975; MATHUR; SPECTOR, 1976; VINCENT; NICHOLLS, 1967), quanto para avaliação da participação da resposta inflamatória na progressão tumoral (FERNANDES et al., 2015; RITTENHOUSE; RITTENHOUSE; TAKEMOTO, 1978) além do emprego na determinação da atividade antitumoral de novos fármacos (AGRAWAL et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; HASSAN; IBRAHIM, 2014; KIMOTO et al., 1983; MANSOUR; EID; EL-ARNAOUTY, 2017; OURIQUE et al., 2016). Devido a estas características e alta taxa de replicabilidade, o TAE foi escolhido como nosso modelo experimental.

As infecções sistêmicas bacterianas que caracterizam o quadro de sepse variam de acordo com a estirpe e virulência da bactéria e carga bacteriana que atinge o paciente ou inoculada em animais experimentais (FINK, 2014; LEVER; MACKENZIE, 2007). O número de unidades formadoras de colônias (UFC) é proporcional à taxa de sobrevivência dos animais. Quanto mais alto o número de UFC mais rápida e mais agressiva será a infecção e menor a taxa de sobrevivência (DOI et al., 2009; FINK, 2014; LEVER; MACKENZIE, 2007). Desse modo para caracterização da infecção sistêmica por *E. coli* foi definida a carga bacteriana (UFC) a ser utilizada no modelo proposto. Buscou-se uma carga bacteriana capaz de induzir de 40-20% de sobrevivência nos animais estabelecendo-se então 3×10^6 UFC como ideal, visto que causou uma taxa de sobrevivência de 20% até as primeiras 24h. Após definir também o número de células TAE como 1×10^7 foram realizadas análises do efeito dessa associação.

Na caracterização do tumor observamos que mesmo frente à infecção por *E. coli*, o tumor não apresentou diminuição do volume, da massa e do número de células tumorais, demonstrando que a infecção não parece exercer qualquer interferência na progressão tumoral como demonstrado por (CRONIN et al., 2010) pela observação em tempo real com método de bioluminescência da migração após a inoculação venosa de bactérias, para o foco tumoral e consequentemente proliferação nessas regiões, não demonstrando interferência alguma no crescimento tumoral. Por outro lado, o ambiente tumoral pode induzir o aumento do crescimento bacteriano, conforme demonstrado por diversos trabalhos com diferentes tipos de bactérias (CRONIN et al., 2010, 2012; LESCHNER; WEISS, 2016) em que sugerem que as bactérias podem ser utilizadas como carreadoras de medicamentos antineoplásicos devido à capacidade de crescimento que estas apresentam no ambiente tumoral em todos experimentos foi possível observar o deslocamento bacteriano após inoculação intravenosa para o foco tumoral. (BABAN et al., 2010; CRONIN et al., 2016; HOFFMAN, 2011; TANGNEY, 2010) O ambiente tumoral pode-se mostrar propício ao crescimento bacteriano possivelmente pela hipóxia localizada no ambiente tumoral, pela variação da resposta imune local e a vascularização do local do tumor, mas a razão pelo qual realmente as bactérias tendem a crescer no ambiente tumoral ainda não está totalmente estabelecida (CRITCHLEY; JEZZARD; VASSAUX, 2009; TANGNEY, 2010; YU; ZHANG; SZALAY, 2008). Demonstramos em nossos resultados que a progressão tumoral não se altera após a infecção por *E. coli* sugerindo que a diminuição da sobrevida dos animais com TAE e *E. coli* está associado ao processo de infecção sistêmica e que o tumor de Ehrlich proporciona um ambiente ideal para o avanço da infecção diminuindo a sobrevida em comparação aos grupos em modelos de TAE e infecção isolados (HOTCHKISS; MOLDAWER, 2014; WILLIAMS et al., 2004).

Ao avaliarmos a infecção observamos que o número de bactérias no sangue nos animais do modelo de TAE e *E. coli* foi maior quando comparado ao grupo que só recebeu *E. coli*, um evento importante que pode estar intimamente relacionada a diminuição da sobrevida dos animais com TAE e *E. coli*. Enquanto no peritônio, o número de bactérias nesses dois grupos (Salina e *E. coli*, TAE e *E. coli*) não foi diferente. Em uma infecção sistêmica a disseminação da bactéria se dá por meio dos vasos sanguíneos. Bactérias Gram negativas como *E. coli* apresentam

endotoxinas (LPS) que podem levar ao aumento da permeabilidade microvascular possibilitando assim o acesso a vascularização(VAN EIJK et al., 2005).

Pacientes com câncer se mostram mais susceptíveis a infecções, principalmente a de cunho sistêmico a sepse. Vem sendo demonstrado que pacientes oncológicos que enfrentam um quadro de sepse apresentam uma menor taxa de sobrevida (CHANOCK, 1993; STAUDINGER; PÈNE, 2014). Nos Estados Unidos foi feita uma estimativa em centros oncológicos que demonstra que dentre os pacientes com câncer 9% das mortalidades é devido a sepse(HARTNETT, 1989; WILLIAMS et al., 2004).

O TAE também pode contribuir para o aumento da permeabilidade vascular o que poderia estar ampliando a disseminação de *E. coli* para a corrente sanguínea dos animais com TAE e *E. coli* (FASTAIA; DUMONT, 1976; FERNANDES et al., 2015; HEMPLING, 1960; LAMBERT; HOFFMANN; CHRISTENSEN, 1987; MAEDA et al., 2000; TEPLOVA et al., 1998). Nossos dados corroboram a hipótese de que o TAE é capaz de induzir o aumento de permeabilidade vascular. A ascite desenvolvida pelo TAE pode estar relacionada a inflamação local após a inoculação das células tumorais. A resposta inflamatória exacerbada acarreta no aumento da permeabilidade vascular o que possibilita o extravasamento do exsudato no local da indução tumoral, o aumento do líquido ascítico é progressivo e irreversível. Ao caracterizar a resposta inflamatória do TAE, Fernandes e colaboradores (2015), demonstrou uma imunossupressão provocada nos organismos dos animais com TAE favorecendo o crescimento tumoral, eles demonstram que na fase da progressão tumoral há um aumento na produção de NO, o qual já está bem descrito que desempenha um papel importante na imunossupressão do organismo. Há também a produção elevada de Prostaglandina E2 (PGE2) e aumento de IL-10 que podem estar associados à supressão de macrófagos. O que nos leva a sugerir que possivelmente essas características já bem estabelecidas do TAE, poderiam estar aumentando a susceptibilidade dos nossos animais com TAE a desenvolverem uma infecção sistêmica mais agravante por *E. coli*, resultando em menor sobrevida.

Já foi descrito que em infecções sistêmicas o agravamento do quadro do paciente se dá pela resposta inflamatória exacerbada frente a infecção (SCHULTE et al., 2013). No pulmão não é diferente disso, a presença das bactérias leva ao aumento da permeabilidade vascular, o que por sua vez leva ao acúmulo de exsudato nos alvéolos pulmonares acometendo a um edema pulmonar caracterizado

como síndrome da angústia respiratória aguda que em muitos casos levam a morte do paciente em poucas horas (KIM; HONG, 2016; MARKIEWSKI; LAMBRIS, 2007; MULLIGAN et al., 1996)

Em infecções sistêmicas já foi demonstrado que o pulmão poder ser o principal órgão afetado, embora os mecanismos ainda não estejam bem definidos (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; SCHULTZ; VAN DER POLL, 2002). Pode-se sugerir que o aumento da permeabilidade microvascular pode estar associado à migração das bactérias a partir da corrente sanguínea. O processo inflamatório pode ser desencadeado após o reconhecimento de componentes bacterianos, como as endotoxinas (LPS) presentes em bactérias Gram-negativas, por receptores como o *Toll-like* (TLR) presentes nas células do hospedeiro.(HOSHINO et al., 1999; ROSSOL et al., 2011). Após o reconhecimento células do sistema imune inato como macrófagos presentes no local da infecção há desencadeamento de uma resposta pró-inflamatória exacerbada com a secreção de citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ entre outras) e quimiocinas (CCL17, CCL22 e CCR4), as quais participam do recrutamento de neutrófilos e macrófagos (CHAUDHRY et al., 2013; NESS et al., 2006; TRAEGER et al., 2008). O aumento dessas células acarreta em aumento de permeabilidade vascular, o que facilita o acesso bacteriano ao tecido pulmonar(VAN DER POLL et al., 2017). Em modelos de sepse induzidas por *E. coli* , por LPS ou ligação e perfuração do ceco (CLP), já foi caracterizado que após algumas horas da a infecção há um aumento significativo de bactérias nos pulmões dos animais(FINK, 2014; GARRIDO; FIGUEIREDO; SILVA, 2004). A presença significativa de bactérias no pulmão de animais com TAE e *E. coli*, nos leva a propor que o aumento da permeabilidade vascular que o TAE confere aos animais, proporciona as bactérias uma via de acesso mais rápida a corrente sanguínea e conseqüentemente a proliferação das bactérias no pulmão, o que condiz com os nossos resultados (BENJAMIM et al., 2002; COLLIN et al., 2004; RAZAVI et al., 2004).

Como demonstrado anteriormente o processo inflamatório desencadeado pela infecção, que acomete os animais, envolve células de defesa, mediadores inflamatórios e vascularização (LONDON et al., 2010; MAYR; YENDE; ANGUS, 2014; VAN DER POLL et al., 2017). Já foi demonstrado que qualquer tipo de tecido vascularizado pode ser o alvo de infecções. Como visto anteriormente o TAE facilita a entrada das bactérias na corrente sanguínea devido ao aumento da permeabilidade vascular, propiciando a infecção em sítios longe do foco infeccioso

inicial. O pulmão é um órgão extremamente vascularizado e em nosso experimento assim como em outros trabalhos com infecções sistêmicas este pode ser considerado como órgão alvo da infecção (DE SOUZA COSTA et al., 2015). A presença de bactérias no pulmão, por sua vez desencadeia um processo inflamatório local, com a produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas (CCL17, CCL22 e CCR4) que atuam no recrutamento dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o foco inflamatório (CHAUDHRY et al., 2013; SCHULTE et al., 2013).

Outros fatores podem contribuir para o agravamento e diminuição da taxa de sobrevida em pacientes com câncer e que desenvolvem infecção sistêmica, como o quadro de imunossupressão acarretado pelo câncer (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013; MITTAL et al., 2015; WILLIAMS et al., 2004). Pois como abordado anteriormente o que pode determinar a evolução de uma infecção local para uma infecção sistêmica são alterações na resposta imune, como retardo no recrutamento das células de defesa, redução na capacidade de produção de citocinas, apoptose, dedução da atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos entre outros agravantes que suprimem a resposta imune inata e adaptativa dos pacientes os deixando mais susceptíveis as infecções (HOTCHKISS; MOLDAWER, 2014; VAN DER POLL et al., 2017).

Com base nos dados apresentados e vasta revisão de literatura, podemos afirmar que o modelo de tumor ascítico de Ehrlich associado à infecção sistêmica por *E. coli*, se mostra como um modelo replicável no qual conseguimos padronizar um tumor o qual se mostra representativo aos tumores que acomete aos humanos, assim como a infecção sistêmica a qual conseguiu simular o quadro de sepse.

Como citado anteriormente, o que nos motivou a padronizar um modelo de tumor associado à infecção foi podermos utilizar este modelo como uma ferramenta experimental abrangendo diversas áreas da saúde.

7 CONCLUSÕES

Atualmente os maiores índices de mortalidade por patologias no mundo estão associados ao câncer e infecções. A existência de um modelo que abranja as duas patologias nos abre novas perspectivas para ampliar o conhecimento sobre as infecções e o câncer, bem como para a descoberta de novas drogas multifuncionais com atividade imunomoduladora, antibacteriana e com atividade antitumoral. Também nos fornece um modelo para caracterização dos mecanismos envolvidos na associação entre tumores e infecções, além da possibilidade de análise de outras bactérias frente ao TAE para avaliação de mecanismos ou fármacos específicos para diferentes tipos de bactérias.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology - 8th Edition**. 8. ed. [s.l.] Elsevier, 2014.

AGRAWAL, S. S. et al. Cytotoxic and antitumor effects of brucine on Ehrlich ascites tumor and human cancer cell line. **Life Sciences**, v. 89, n. 5–6, p. 147–158, 1 ago. 2011.

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4th. ed. [s.l.] Garland Science, 2002.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Find Cancer Treatment and Support | American Cancer Society**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment.html>>. Acesso em: 4 mar. 2017.

ANDES, D.; CRAIG, W. A. Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, n. 4, p. 261–268, abr. 2002.

ANDRÉJAK, C. et al. Characterization of mouse models of Mycobacterium avium complex infection and evaluation of drug combinations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2129–2135, abr. 2015.

BABAN, C. K. et al. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 6, p. 385–394, 2010.

BEACHY, P. A.; KARHADKAR, S. S.; BERMAN, D. M. Mending and malignancy. **Nature**, v. 431, n. 7007, p. 402, 23 set. 2004.

BENJAMIM, C. F. et al. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3602–3610, jul. 2002.

BLAYLOCK, R. L. Cancer microenvironment, inflammation and cancer stem cells: A hypothesis for a paradigm change and new targets in cancer control. **Surgical Neurology International**, v. 6, p. 92, 2015.

BONNET, M. et al. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 859–867, 15 fev. 2014.

BRENNEMAN, D. E.; MATHUR, S. N.; SPECTOR, A. A. Characterization of the hyperlipidemia in mice bearing the Ehrlich ascites tumor. **European Journal of Cancer** (1965), v. 11, n. 4, p. 225–230, 1 abr. 1975.

BROCK, A.; KRAUSE, S.; INGBER, D. E. Control of cancer formation by intrinsic genetic noise and microenvironmental cues. **Nature Reviews. Cancer**, v. 15, n. 8, p. 499–509, ago. 2015.

BUER, J.; BALLING, R. Mice, microbes and models of infection. **Nature Reviews. Genetics**, v. 4, n. 3, p. 195–205, mar. 2003.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 854–865, out. 2005.

CALIXTO-CAMPOS, C. et al. The Ehrlich tumor induces pain-like behavior in mice: a novel model of cancer pain for pathophysiological studies and pharmacological screening. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 624815, 2013.

CARRUTHERS, V. B.; COTTER, P. A.; KUMAMOTO, C. A. Microbial Pathogenesis: Mechanisms of Infectious Disease. **Cell host & microbe**, v. 2, n. 4, p. 214–219, 11 out. 2007a.

CARRUTHERS, V. B.; COTTER, P. A.; KUMAMOTO, C. A. Microbial Pathogenesis: Mechanisms of Infectious Disease. **Cell host & microbe**, v. 2, n. 4, p. 214–219, 11 out. 2007b.

CDC. **General Information| E.coli | CDC.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

CHA, E. K.; EASTHAM, J. A. Chemotherapy and novel therapeutics before radical prostatectomy for high-risk clinically localized prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 33, n. 5, p. 217–225, 1 maio 2015.

CHANG, H. Y. et al. Causes of death in adults with acute leukemia. **Medicine**, v. 55, n. 3, p. 259–268, maio 1976.

CHANOCK, S. Evolving risk factors for infectious complications of cancer therapy. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 7, n. 4, p. 771–793, ago. 1993.

CHAUDHRY, H. et al. Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 27, n. 6, p. 669–684, 2013.

CHEN, R. et al. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. **American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)**, v. 57, n. 2, p. 93–107, fev. 2007.

CHEON, D.-J.; ORSULIC, S. Mouse models of cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 95–119, 2011.

CHURCH, D. M. et al. Lineage-Specific Biology Revealed by a Finished Genome Assembly of the Mouse. **PLOS Biology**, v. 7, n. 5, p. e1000112, 26 maio 2009.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71–87, 1 mar. 2012.

COLLIN, M. et al. Reduction of the multiple organ injury and dysfunction caused by endotoxemia in 5-lipoxygenase knockout mice and by the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 5, p. 961–970, 1 nov. 2004.

COOPER, G. M. The Development and Causes of Cancer. 2000.

CORVALÁN, A. C. B. **Aplicação do micrométodo espectrofotométrico para determinação de azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos wistar..** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1994.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 19 dez. 2002.

CRITCHLEY, R. J.; JEZZARD, S.; VASSAUX, G. Genetically Engineered *E. coli* as a Protein Delivery Vehicle for Killing Cancer Cells. **Discovery Medicine**, v. 4, n. 22, p. 194–197, 20 jun. 2009.

CRONIN, M. et al. Orally Administered Bifidobacteria as Vehicles for Delivery of Agents to Systemic Tumors. **Molecular Therapy**, v. 18, n. 7, p. 1397–1407, jul. 2010.

CRONIN, M. et al. High Resolution In Vivo Bioluminescent Imaging for the Study of Bacterial Tumour Targeting. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 25 jan. 2012.

CRONIN, M. et al. In Vivo Bioluminescence Imaging of Intratumoral Bacteria. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1409, p. 69–77, 2016.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 26–38, 2010.

CUMMINS, J.; TANGNEY, M. Bacteria and tumours: causative agents or opportunistic inhabitants? **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, n. 1, p. 11, 28 mar. 2013.

DAMASCENO, D. D. et al. Perfil da incidência bacteriana e resistência antimicrobiana em uma instituição hospitalar. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 12, n. 1, p. 104–109, 2008.

DE JONG, M.; MAINA, T. Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 4, p. 501–504, abr. 2010a.

DE JONG, M.; MAINA, T. Of mice and humans: are they the same?--Implications in cancer translational research. **Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 4, p. 501–504, abr. 2010b.

DE SOUZA COSTA, M. F. et al. Murine IL-17+ V γ 4 T lymphocytes accumulate in the lungs and play a protective role during severe sepsis. **BMC Immunology**, v. 16, 3 jun. 2015.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, abr. 2011.

DOI, K. et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 2868–2878, out. 2009.

DONNENBERG, M. S. et al. Bacterial Factors Associated with Lethal Outcome of Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection: Genomic Case-Control Studies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, 15 maio 2015.

DUDLEY, M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5594, p. 850–854, 25 out. 2002.

DZIVENU, O. K.; PHIL, D.; O'DONNELL-TORM, J. **Cancer and the Immune System: The Vital Connection**. Disponível em: <<https://www.merlot.org/merlot/viewMaterial.htm?id=386731>>. Acesso em: 28 maio. 2017.

EYERICH, S. et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 12, p. 3573–3585, dez. 2009.

FASTAIA, J.; DUMONT, A. E. Pathogenesis of ascites in mice with peritoneal carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 56, n. 3, p. 547–550, mar. 1976.

FERNANDES, P. D. et al. Characterization of the inflammatory response during Ehrlich ascitic tumor development. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 83–89, fev. 2015.

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, v. 32, n. 3–4, p. 283–288, mar. 1991.

FERREIRA, A. K. et al. Anticancer effects of synthetic phosphoethanolamine on Ehrlich ascites tumor: an experimental study. **Anticancer Research**, v. 32, n. 1, p. 95–104, jan. 2012.

FINK, M. P. Animal models of sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 143–153, 1 jan. 2014.

FLAVELL, R. A. et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 8, ago. 2010.

FOX, A. C. et al. Cancer causes increased mortality and is associated with altered apoptosis in murine sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 3, p. 886–893, mar. 2010.

FREIFELD, A. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 4, p. e56–e93, 15 fev. 2011.

FREIFELD, A. G.; KAUL, D. R. Infection in the Patient with Cancer. 22 out. 2013.

GARRIDO, A. G.; FIGUEIREDO, L. F. P. DE; SILVA, M. R. E. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 82–88, abr. 2004.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41, n. 6, p. 848–854, 15 set. 2005.

HAMANN, D. et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 9, p. 1407–1418, 3 nov. 1997.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HARMEY, J. H. et al. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion. **International Journal of Cancer**, v. 101, n. 5, p. 415–422, 10 out. 2002.

HARTNETT, S. Septic shock in the oncology patient. **Cancer Nursing**, v. 12, n. 4, p. 191–201, ago. 1989.

HASSAN, A. I.; IBRAHIM, R. Y. M. Some genetic profiles in liver of Ehrlich ascites tumor-bearing mice under the stress of irradiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 188–197, abr. 2014.

HEMPLING, H. G. Permeability of the Ehrlich Ascites Tumor Cell to Water. **The Journal of General Physiology**, v. 44, n. 2, p. 365–379, 1 nov. 1960.

HOFFMAN, R. M. Tumor-seeking Salmonella amino acid auxotrophs. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 917–923, dez. 2011.

HOMSI, J. et al. Infectious complications of advanced cancer. **Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 8, n. 6, p. 487–492, nov. 2000.

HORAN, T. C.; ANDRUS, M.; DUDECK, M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **American Journal of Infection Control, Hand Hygiene and Infection**. v. 36, n. 5, p. 309–332, jun. 2008.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, Invited Review Issue 2010. v. 48, n. 3, p. 424–434, 15 fev. 2010.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 162, n. 7, p. 3749–3752, 1 abr. 1999.

HOSOYA, Y. et al. Successful treatment of esophageal squamous cell carcinoma in a patient with Fanconi anemia. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 8, p. 805–810, ago. 2010.

HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L. Parallels between cancer and infectious disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 4, p. 380–383, 24 jul. 2014.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862–874, dez. 2013.

HOWELL, V. M.; COLVIN, E. K. Genetically engineered insertional mutagenesis in mice to model cancer: Sleeping Beauty. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1194, p. 367–383, 2014.

HUDACK, E. D.; BAKER, N. Studies on Ehrlich ascites cell nuclei. **Experimental Cell Research**, v. 22, p. 327–337, 1 jan. 1961.

HUGHES, W. T. et al. 2002 Guidelines for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients with Cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 6, p. 730–751, 15 mar. 2002.

ISHII, N. et al. [Analysis of the Risk Factors of Febrile Neutropenia Among 72 Women Receiving FEC in Early Breast Cancer Chemotherapy]. **Gan to Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 1555–1557, nov. 2016.

JELICKS, L. A. et al. Imaging of Small-Animal Models of Infectious Diseases. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 2, p. 296–304, fev. 2013.

JOUBERT, A. et al. Biologie des radiations : avancées majeures et perspectives pour la radiothérapie. **Cancer/Radiothérapie**, Dossier “Radiobiologie” (1re partie), coordonne par Eric Deutsch. v. 15, n. 5, p. 348–354, ago. 2011a.

JOUBERT, A. et al. [Radiation biology: major advances and perspectives for radiotherapy]. **Cancer Radiothérapie: Journal De La Societe Francaise De Radiotherapie Oncologique**, v. 15, n. 5, p. 348–354, ago. 2011b.

KABEL, A. M.; ELMAABOUD, M. A. A. Murine Models of Cancer. **Journal of Cancer Research and Treatment, Journal of Cancer Research and Treatment**, v. 2, n. 1, p. 16–18, 23 jan. 2014.

KAGESHITA, T. et al. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. **The American Journal of Pathology**, v. 154, n. 3, p. 745–754, mar. 1999.

KAWANISHI, S. et al. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. **Biological Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 365–372, abr. 2006.

KAWANISHI, S. et al. Nitrative and oxidative DNA damage in infection-related carcinogenesis in relation to cancer stem cells. **Genes and Environment**, v. 38, p. 1–12, 1 jan. 2017.

KIM, H. K.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. Mouse models for infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 410, p. 88–99, ago. 2014.

KIM, W.-Y.; HONG, S.-B. Sepsis and Acute Respiratory Distress Syndrome: Recent Update. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, v. 79, n. 2, p. 53–57, abr. 2016.

KIMOTO, E. et al. Enhancement of antitumor activity of ascorbate against Ehrlich ascites tumor cells by the copper:glycylglycylhistidine complex. **Cancer Research**, v. 43, n. 2, p. 824–828, fev. 1983.

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; XU, Y. Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 19, n. 10, p. 543–555, out. 2000.

KLEIN, G. Use of the Ehrlich ascites tumor of mice for quantitative studies on the growth and biochemistry of neoplastic cells. **Cancer**, v. 3, n. 6, p. 1052–1061, 1 jan. 1950.

KÖHLER, C.-D.; DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 301, n. 8, p. 642–647, dez. 2011.

KUGELBERG, E. et al. Establishment of a Superficial Skin Infection Model in Mice by Using *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3435–3441, ago. 2005.

LAGU, T. et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 3, p. 754–761, mar. 2012.

LAMBERT, I. H.; HOFFMANN, E. K.; CHRISTENSEN, P. Role of prostaglandins and leukotrienes in volume regulation by Ehrlich ascites tumor cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 98, n. 3, p. 247–256, 1 out. 1987.

LANDSKRON, G. et al. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. e149185, 13 maio 2014.

LEE, C. N. et al. Development of instruments to measure the quality of breast cancer treatment decisions. **Health Expectations: An International Journal of Public Participation in Health Care and Health Policy**, v. 13, n. 3, p. 258–272, set. 2010.

LEE, E.-Y. et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. **Proteomics**, v. 9, n. 24, p. 5425–5436, dez. 2009.

LEE, W.-B. et al. Mincle activation enhances neutrophil migration and resistance to polymicrobial septic peritonitis. **Scientific Reports**, v. 7, 23 jan. 2017.

LEHOURITIS, P. et al. Local bacteria affect the efficacy of chemotherapeutic drugs. **Scientific Reports**, v. 5, p. 14554, 29 set. 2015.

LESCHNER, S.; WEISS, S. Noninvasive In Vivo Imaging to Follow Bacteria Engaged in Cancer Therapy. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1409, p. 61–68, 2016.

LEVER, A.; MACKENZIE, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. **BMJ: British Medical Journal**, v. 335, n. 7625, p. 879–883, 27 out. 2007.

LIEBCHEN, A. et al. Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients with Diarrhea in São Paulo, Brazil: Identification of Intermediate Virulence Factor Profiles by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2274–2278, 1 jun. 2011.

LIU, Y. et al. **Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research**. Disponível em: <<http://qims.amegroups.com/article/view/7044/8821>>. Acesso em: 28 maio. 2017.

LONDON, N. R. et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 23, p. 23ra19, 17 mar. 2010.

LUSTBERG, M. B. Management of Neutropenia in Cancer Patients. **Clinical advances in hematology & oncology: H&O**, v. 10, n. 12, p. 825–826, dez. 2012.

LYMAN, G. H. et al. Predicting individual risk of neutropenic complications in patients receiving cancer chemotherapy. **Cancer**, v. 117, n. 9, p. 1917–1927, 1 maio 2011.

LYONS, J. D. et al. Murine Lung Cancer Increases CD4+ T Cell Apoptosis and Decreases Gut Proliferative Capacity in Sepsis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 28 mar. 2016.

MACCALLI, C.; SCARAMUZZA, S.; PARMIANI, G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 58, n. 5, p. 801–808, maio 2009.

MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–662, dez. 2004.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1–2, p. 271–284, 1 mar. 2000.

MALACHOWA, N. et al. Mouse model of Staphylococcus aureus skin infection. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1031, p. 109–116, 2013.

MANSOUR, H. H.; EID, M.; EL-ARNAOUTY, M. B. Effect of silver nanoparticles synthesized by gamma radiation on the cytotoxicity of doxorubicin in human cancer cell lines and experimental animals. **Human & Experimental Toxicology**, p. 960327116689717, 1 jan. 2017.

MARKIEWSKI, M. M.; LAMBRIS, J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 3, p. 715–727, set. 2007.

MARTINO, R. et al. Effect of Discontinuing Prophylaxis with Norfloxacin in Patients with Hematologic Malignancies and Severe Neutropenia. **Acta Haematologica**, v. 99, n. 4, p. 206–211, 1998.

MARUSYK, A.; ALMENDRO, V.; POLYAK, K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 5, p. 323–334, 19 abr. 2012.

MASCHMEYER, G. et al. Diagnosis and antimicrobial therapy of lung infiltrates in febrile neutropenic patients (allogeneic SCT excluded): updated guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Medical Oncology (DGHO). **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 26, n. 1, p. 21–33, jan. 2015.

MATHUR, S. N.; SPECTOR, A. A. Characterization of the Ehrlich ascites tumor plasma lipoproteins. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 424, n. 1, p. 45–56, 22 jan. 1976.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4–11, 1 jan. 2014.

MCCULLERS, J. A.; REHG, J. E. Lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 3, p. 341–350, 1 ago. 2002.

MITTAL, R. et al. Murine Lung Cancer Induces Generalized T Cell Exhaustion. **The Journal of surgical research**, v. 195, n. 2, p. 541–549, 15 maio 2015.

MULLIGAN, M. S. et al. Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 2, p. 503–512, 15 jul. 1996.

MURATA, M. et al. Role of nitrate and oxidative DNA damage in inflammation-related carcinogenesis. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 623019, 2012.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, jan. 1998.

NESS, T. L. et al. CCR4 Is a Key Modulator of Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 11, p. 7531–7539, 1 dez. 2006.

NIEBOER, P. et al. Factors influencing catheter-related infections in the Dutch multicenter study on high-dose chemotherapy followed by peripheral SCT in high-risk breast cancer patients. **Bone Marrow Transplantation**, v. 42, n. 7, p. 475–481, out. 2008.

NISHI, T.; TSUCHIYA, K. Experimental respiratory tract infection with *Klebsiella pneumoniae* DT-S in mice: chemotherapy with kanamycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 17, n. 3, p. 494–505, mar. 1980.

NISHIMURA, T. et al. Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 5, p. 617–628, 6 set. 1999.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 24, n. 5, p. 478–483, out. 2011.

OPPENHEIM, J. et al. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. Suppl 2, p. ii17–ii21, nov. 2003.

OTT, E. et al. The Prevalence of Nosocomial and Community Acquired Infections in a University Hospital. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 110, n. 31–32, p. 533–540, ago. 2013.

OURIQUE, F. et al. In vivo inhibition of tumor progression by 5 hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone) and 2-(4-hydroxyanilino)-1,4-naphthoquinone (Q7) in combination with ascorbate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 477, n. 4, p. 640–646, 2 set. 2016.

PAPADOPOULOS, M. C. et al. Molecular mechanisms of brain tumor edema. **Neuroscience**, v. 129, n. 4, p. 1011–1020, 2004.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 13 maio 2010.

PÉREZ-HERRERO, E.; FERNÁNDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 52–79, jun. 2015.

PFEIFER, G. P. Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes. **Genome Medicine**, v. 2, p. 54, 2010.

PFEIFER, G. P. How the environment shapes cancer genomes. **Current opinion in oncology**, v. 27, n. 1, p. 71–77, jan. 2015.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, n. S3, p. 962–970, Agosto 1993.

PLETZER, D. et al. New Mouse Model for Chronic Infections by Gram-Negative Bacteria Enabling the Study of Anti-Infective Efficacy and Host-Microbe Interactions. **mBio**, v. 8, n. 1, p. e00140-17, 8 mar. 2017.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 30 Suppl 1, p. 53–59, out. 2008.

PRADO, B. B. F. DO. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 21–24, 2014.

QUEIROZ, M. L. S. et al. Ehrlich ascites tumor as a tool in the development of compounds with immunomodulatory properties. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 26, n. 4, p. 511–525, 2004.

RAMPHAL, R. Changes in the etiology of bacteremia in febrile neutropenic patients and the susceptibilities of the currently isolated pathogens. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 39 Suppl 1, p. S25-31, 15 jul. 2004.

RAZAVI, H. M. et al. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, n. 3, p. 227–233, 1 ago. 2004.

READ, S. A.; DOUGLAS, M. W. Virus induced inflammation and cancer development. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 174–181, 10 abr. 2014.

RENOIS, F. et al. Preliminary investigation of a mice model of Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae induced pneumonia. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 1045–1051, nov. 2011.

RITTENHOUSE, H. G.; RITTENHOUSE, J. W.; TAKEMOTO, L. Characterization of the cell coat of Ehrlich ascites tumor cells. **Biochemistry**, v. 17, n. 5, p. 829–837, 7 mar. 1978.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009.

ROBERTS, N. J. et al. Intratumoral injection of Clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 249, p. 249ra111, 13 ago. 2014.

RODRIGUES, A. F. F. SISTEMA IMUNOLÓGICO NO COMBATE AO CÂNCER: EVASÃO DA VIGILÂNCIA IMUNOLÓGICA. **FACIDER - Revista Científica**, v. 3, n. 3, 5 jan. 2013.

ROLSTON, K. V. I. New antimicrobial agents for the treatment of bacterial infections in cancer patients. **Hematological Oncology**, v. 27, n. 3, p. 107–114, set. 2009.

ROSSOL, M. et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379–446, 2011.

SAFDAR, A.; ARMSTRONG, D. Infections in patients with hematologic neoplasms and hematopoietic stem cell transplantation: neutropenia, humoral, and splenic defects. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 53, n. 8, p. 798–806, out. 2011.

SANDS, A. T. The master mammal. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 31–32, jan. 2003.

SAÚDE, A. C. et al. **Clavanin bacterial sepsis control using a novel methacrylate nanocarrier**. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/clavanin-bacterial-sepsis-control-using-a-novel-methacrylate-nanocarri-peer-reviewed-article-IJN>>. Acesso em: 29 maio. 2017.

SCHULTE, W. et al. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets; An Updated View. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. e165974, 18 jun. 2013.

SCHULTZ, M. J.; VAN DER POLL, T. Animal and human models for sepsis. **Annals of Medicine**, v. 34, n. 7–8, p. 573–581, 2002.

SELLE, F. et al. Chimiothérapie à hautes doses comme stratégie pour contourner la résistance aux médicaments dans les tumeurs solides. **Bulletin du Cancer**, v. 103, n. 10, p. 861–868, 1 out. 2016.

SHAH, A. P. et al. Expanding the use of real-time electromagnetic tracking in radiation oncology. **Journal of Applied Clinical Medical Physics**, v. 12, n. 4, p. 3590, 15 nov. 2011.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 3, p. 787–795, mar. 2012.

SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p. 20–31, ago. 2015.

SILVA, O. N. et al. An anti-infective synthetic peptide with dual antimicrobial and immunomodulatory activities. **Scientific Reports**, v. 6, p. 35465, 2 nov. 2016.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; GUNTHER, N. W. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 2, p. 134–163, 2007.

SOUZA, D. G. et al. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 5, p. 985–994, nov. 2001.

STARR, M. E. et al. A New Cecal Slurry Preparation Protocol with Improved Long-Term Reproducibility for Animal Models of Sepsis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, 22 dez. 2014.

STAUDINGER, T.; PÈNE, F. Current insights into severe sepsis in cancer patients. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 26, n. 4, p. 335–338, 2014.

STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The Pathogenesis of Sepsis. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 19–48, 2011.

STEEG, P. S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 895–904, ago. 2006.

SUS. **Manual de bases técnicas da oncologia – SIA/SUS - Sistema de informações ambulatoriais [BVS]**. 17. ed. Brasília: [s.n.].

SYDNOR, E. R. M.; PERL, T. M. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 141–173, jan. 2011.

TALMADGE, J. E. et al. Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793–804, mar. 2007.

TANGNEY, M. Gene therapy for cancer: dairy bacteria as delivery vectors. **Discovery Medicine**, v. 10, n. 52, p. 195–200, set. 2010.

TEPLOVA, V. V. et al. Effect of prooxidants on mitochondrial permeability transition and cell death in Ehrlich ascites tumour cells. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 45, n. 3, p. 501–510, jul. 1998.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. [s.l.: s.n.].

TRAEGER, T. et al. Detrimental Role of CC Chemokine Receptor 4 in Murine Polymicrobial Sepsis. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 5285–5293, 1 nov. 2008.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275–292, 14 out. 2011.

VAN DER POLL, T. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews. Immunology**, 24 abr. 2017.

VAN EIJK, L. T. et al. Microvascular permeability during experimental human endotoxemia: an open intervention study. **Critical Care**, v. 9, n. 2, p. R157–R164, 2005.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277–283, abr. 2015.

VIDAL, L. et al. Oral versus intravenous antibiotic treatment for febrile neutropenia in cancer patients: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 29–37, jul. 2004.

VINCENT, P. C.; NICHOLLS, A. Comparison of the Growth of the Ehrlich Ascites Tumor in Male and Female Mice. **Cancer Research**, v. 27, n. 6 Part 1, p. 1058–1065, 1 jun. 1967.

WALKER, M. J.; BEATSON, S. A. Outsmarting outbreaks. **Science**, v. 338, n. 6111, p. 1161–1162, 30 nov. 2012.

WESTON, A.; HARRIS, C. C. Multistage Carcinogenesis. 2003.

WHITE, L.; YBARRA, M. Neutropenic fever. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 32, n. 3, p. 549–561, ago. 2014.

WHO. **WHO | World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 28 maio. 2017.

WIERSINGA, W. J. et al. Host innate immune responses to sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 36–44, 1 jan. 2014.

WILES, S. et al. Modelling infectious disease - time to think outside the box? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 307–312, abr. 2006.

WILLIAMS, M. D. et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. **Critical Care**, v. 8, n. 5, p. R291–R298, 2004.

WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. **The Journal of Infection**, v. 59 Suppl 1, p. S4-16, set. 2009.

XING, L. et al. Overview of image-guided radiation therapy. **Medical Dosimetry: Official Journal of the American Association of Medical Dosimetrists**, v. 31, n. 2, p. 91–112, 2006.

XUAN, C. et al. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e83744, 2014.

YU, Y. A.; ZHANG, Q.; SZALAY, A. A. Establishment and characterization of conditions required for tumor colonization by intravenously delivered bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 567–578, 15 jun. 2008.

ZAMBIRINIS, C. P. et al. Pancreatic Cancer, Inflammation and Microbiome. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, v. 20, n. 3, p. 195–202, 2014.

ZEMBOWER, T. R. Epidemiology of infections in cancer patients. **Cancer Treatment and Research**, v. 161, p. 43–89, 2014.

ZIMMERLI, W. et al. Pathogenesis of Foreign Body Infection: Description and Characteristics of an Animal Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 146, n. 4, p. 487–497, 1 out. 1982.

ZIYAD, S.; IRUELA-ARISPE, M. L. Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 12, p. 1085–1096, dez. 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A



Figura 1A. Diferença corporal entre camundongos Balb-c sem indução do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e com indução do tumor. **a)** Animal inoculado com salina. **b)** Animal após 7 dias de indução do TAE 1×10^7 .

APÊNDICE B

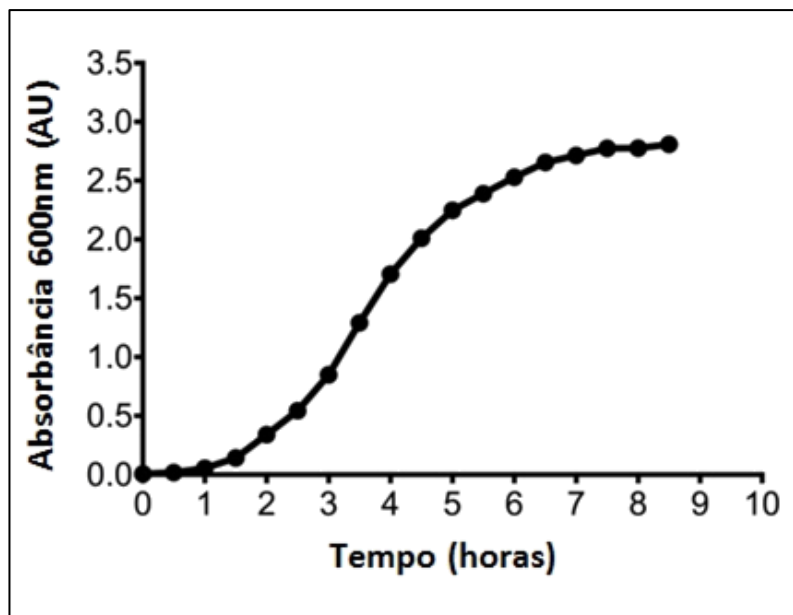


Figura 1B. Curva de crescimento de *E. coli* ATCC 25922. Com o intuito de determinar a velocidade do crescimento bacteriano com o padrão de absorbância Uma colônia da bactéria foi inoculada em MH caldo e a cada 30min foi feita a leitura em espectrofotômetro até atingir a fase estacionária.

Tabela 1B. Padronização do número de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro de *E. coli* ATCC25922 . Para a determinação de UFC/mL, 200µL de um pré inóculo de *E. coli* em meio MH caldo, foi inoculado em 10mL de meio MH novo e após atingir a ~ 1,0 O.D foram feitas diluições seriadas e plaqueadas pelo método de micro gotas em meio MH ágar após 24horas foi feita a contagem das colônias. Foram feitas triplicatas biológicas e técnicas.

Réplicas Biológicas	O.D	Diluição	R1	R2	R3	Média	Média x Diluição	UFC/mL	Média UFC/mL	Média UFC/mL
1	1,08	5	45	35	43	41	4,10E+06	4,10E+08	2,33E+08	2,17E+08
2	0,67	5	14	14	18	15	1,53E+06	1,53E+08		
3	0,92	5	17	13	11	14	1,37E+06	1,37E+08		
1	1,08	6	2	5	7	5	4,67E+06	4,67E+08	2,00E+08	
2	0,67	6	0	1	2	1	1,00E+06	1,00E+08		
3	0,92	6	0	0	1	0	3,33E+05	3,33E+07		

Tabela 2B. Número de unidades formadoras (UFC) de *E. coli* ATCC 25922 inoculadas nos animais para avaliação da curva de sobrevivência. 200µL de um pré inóculo de *E. coli* em meio MH caldo, foi inoculado em 10mL de meio MH novo e após atingir a ~1,0 O.D as cargas bacterianas foram determinadas baseando-se no número de UFC/mL, após a inoculação nos animais os inóculos foram diluídos em série e plaqueados pelo método de micro gotas em meio MH ágar, após 24 horas foi feita a contagem das colônias para confirmação do inóculo. Foram feitas triplicatas técnicas.

Diluição	R1	R2	R3	Média	Média x Diluição	UFC/mL	Média/mL	em 200µL
5	28	29	29	29	2,87E+06	2,87E+08		
6	4	4	10	6	6,00E+06	6,00E+08	5,18E+08	1,04E+08
7	1	1	0	1	6,67E+06	6,67E+08		
4	13	17	12	14	1,40E+05	1,40E+07		
5	1	1	0	1	1,00E+05	1,00E+07	1,91E+07	3,82E+06
6	1	0	0	0	3,33E+05	3,33E+07		
3	28	25	28	27	2,70E+04	2,70E+06		
4	1	1	4	2	2,00E+04	2,00E+06	3,79E+06	7,58E+05
5	2	0	0	1	6,67E+04	6,67E+06		

APÊNDICE C

Tabela 1C. Número de unidades formadoras (UFC) de *E. coli* ATCC 25922 inoculadas nos animais para avaliação da curva de sobrevivência em animais com TAE e *E. coli*. 200µL de um pré inóculo de *E. coli* em meio MH caldo, foi inoculado em 10mL de meio MH novo e após atingir a ~ 1,0 O.D as cargas bacterianas foram determinadas baseando-se no número de UFC/mL, após a inoculação nos animais os inóculos foram diluídos em série e plaqueados pelo método de micro gotas em meio MH ágar, após 24 horas foi feita a contagem das colônias para confirmação do inóculo. Foram feitas triplicatas técnicas.

Diluição	R1	R2	R3	Média	Média x Diluição	UFC/mL	Média /mL	em 200µl
D4	43	35	40	39	3,93E+05	3,93E+07	7,47E+07	1,49E+07
D5	15	5	13	11	1,10E+06	1,1E+08		
D3	25	31	38	31	3,13E+04	3,13E+06	1,67E+07	3,34E+06
D4	14	11	16	14	1,37E+05	1,4E+07		
D5	4	5	1	3	3,33E+05	3,3E+07		
D3	37	39	50	42	4,20E+04	4,20E+06	5,07E+06	1,01E+06
D4	3	4	6	4	4,33E+04	4,33E+06		
D5	0	1	1	1	6,67E+04	6,67E+06		

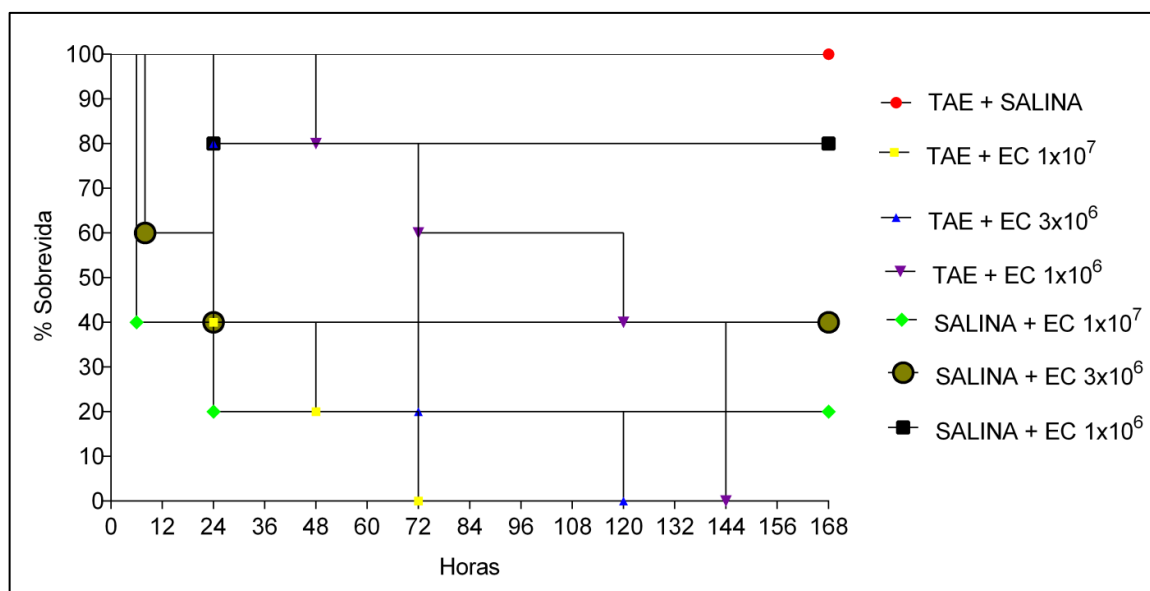


Figura 1C. Curva de sobrevivência de animais inoculados com tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e infecção por *E. coli*. Após 7 dias da indução do tumor com TAE 1×10^7 os animais foram infectados com *E. coli* (EC) em diferentes cargas bacterianas ($\sim 1 \times 10^7$, 3×10^6 e 1×10^6 UFC). Os animais foram monitorados por 168 horas (7 dias) após a infecção.

APÊNDICE D

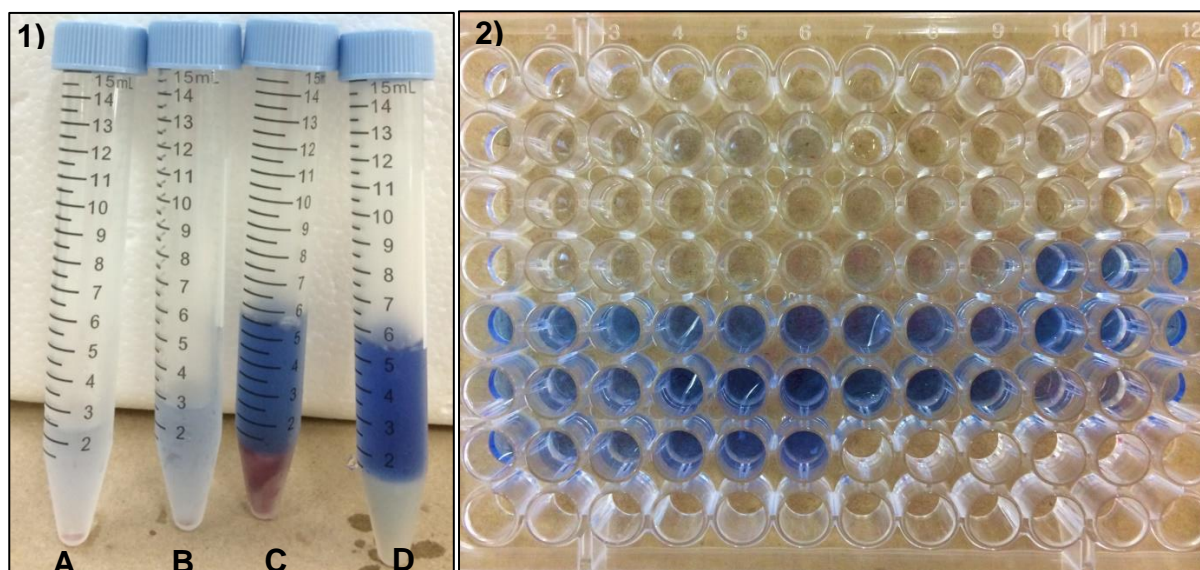


Figura 1D. Ensaio de permeabilidade vascular em modelo de TAE e infecção por *E. coli*. Os animais ($n=5$) receberam o Tumor ou salina (i.p), após sete dias os animais foram infectados com *E. coli* (ATCC 25922) 3×10^6 UFC ou receberam apenas salina, após dada 1h da infecção os animais receberam uma injeção no plexo ocular contendo azul de Evans $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Dado seis horas do inóculo os animais foram anestesiados e eutanasiados. Foi realizada a coleta do líquido ascístico, injetou-se 3mL de Salina/EDTA no peritônio e por punção intraperitoneal foi realizada a coleta do líquido. O Líquido coletado foi centrifugado e no sobrenadante foi feita a leitura em absorbância 650nm. Foram feitas triplicatas técnicas de cada animal. Os resultados foram expressos como quantidade do corante azul de Evans $\mu\text{M}/\text{mL}$, baseando-se numa curva padrão já conhecida do corante ($100 \mu\text{M}$ - $0,001 \mu\text{M}$). **1-** Exsudato após centrifugação. **a)** Salina + salina. **b)** Salina+ *E. coli*. **c)** TAE + *E. coli*. **d)** TAE + Salina. **2-** placa com sobrenadantes das amostras para leitura em ELISA.