



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**CAMILA FERNANDES**

**A DEPLEÇÃO DE CÉLULAS TREGS AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

FORTALEZA

2017

**CAMILA FERNANDES**

**A DEPLEÇÃO DE CÉLULAS TREGS AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F399d Fernandes, Camila.  
A depleção de células tregs agrava a mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano / Camila Fernandes. – 2017.  
126 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior.
1. Mucosite intestinal. 2. Irinotecano. 3. Células T regulatórias. 4. Inflamação. 5. Intestino. I. Título.  
CDD 615.1
-

**CAMILA FERNANDES**

**A DEPLEÇÃO DE CÉLULAS TREGS AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior (orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Danielle Macedo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª Drª Lilia Maria Carneiro Câmara  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profª Drª Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP)

À Deus.

À minha mãe, Maria.

Ao professor Ronaldo (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FUNCAP, pelo financiamento da pesquisa (FUNCAP e CNPq) e pela bolsa de doutorado (CAPES).

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas a este trabalho.

Ao Professor Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), por ser exemplo de competência, aliando o exercício da medicina à pesquisa e à docência. Por ter criado o laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), o qual mantinha com dedicação e amor. Por todos os momentos e conversas agradáveis fora dos muros do laboratório. Por nos ter permitido (alunos do LAFICA) conhecê-lo em essência, como pessoa generosa que era. Meus sinceros agradecimentos pela acolhida e pelos preciosos ensinamentos.

Ao Professor Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior, pela orientação maravilhosa e acolhimento. Por ser um exemplo de ser humano, tratando a todos com igualdade, desde o porteiro ao doutor. Por ser sempre atencioso, bondoso e paciente, além de um docente e pesquisador excepcional. Por ser um líder nato, apoiando seus alunos, elogiando, motivando e os criticando (gentilmente) quando necessário. Por toda liberdade dada a mim no âmbito da pesquisa, acatando sugestões e ideias. Pelo seu otimismo sempre presente, mesmo nos momentos de desespero dos seus alunos. Minha sincera gratidão pelo acolhimento e orientação.

À Professora Dr<sup>a</sup> Lilia Maria Carneiro Câmara, pela enorme contribuição para minha formação. Por ter despertado em mim o amor pela docência e pela imunologia. Por todas as horas dispensadas na minha formação. Por ter me ensinado a ser bastante criteriosa e cuidadosa na realização dos experimentos. Por todos os conselhos acadêmicos e pessoais, além de auxílio (inclusive financeiro) em alguns momentos. Por ter exercido grande influência sobre a minha personalidade acadêmica, muito obrigada.

À Professora Dr<sup>a</sup> Deysi Viviana Tenazoa Wong, por todos os ensinamentos práticos. Pela pessoa gentil, simpática e agradável que é e por me ouvir atentamente nos momentos de desabafo. Por tornar os dias no LAFICA mais agradáveis.

À professora Mariana, por ter tocado o LAFICA na ausência do professor Roberto. Pelos momentos agradáveis ao lado da banda "Inflamasamba".

Aos colegas de laboratório, Carlos Wagner Wanderley e Camila Meireles, pelo auxílio na realização dos experimentos de extração dos linfócitos do intestino delgado. Seria quase impossível a realização desses experimentos sem a ajuda deles. Pelos momentos de descontração, ao lado do professor Ronaldo, nos finais de expediente. Ao Carlos Wagner, em especial, pelas idéias em pesquisa, pelos momentos de discussão científica e pelo acolhimento no LAFICA.

Aos demais colegas do LAFICA, Maraiza Alves, Anielle Torres, Lucas Carvalho, Lucas Nicolau, Lívia Nobre, Lívia Talita, Diego Holanda e Larisse Lucetti, pelos momentos agradáveis juntos e por tornar essa caminhada mais leve.

Ao aluno de iniciação científica, André Cândido, pelas horas dispensadas na realização dos experimentos e pela montagem de "engenhocas" para que os mesmos fossem realizados.

Às técnicas de laboratório, Vandinha França e Denilde Amorim, pela competência profissional, organização e auxílio.

À minha amiga Renata Falcão, pela companhia no laboratório após a viagem do professor Roberto para Itália. Por todos PCRs realizados e pelas conversas agradáveis nos intervalos. Por ser sempre gentil, amiga e disponível.

Aos colegas do LABICONTE, em especial à amiga Cristhyane Costa, pela realização do western blot, pela companhia agradável e pela pessoa maravilhosa que é.

Ao meu amor, Heitor Muniz, por ter me ensinado o verdadeiro sentido da palavra amor e por dar mais sentido à minha vida. Por ter contribuído enormemente para o meu crescimento e amadurecimento pessoal. Por ter sido o principal responsável pelo encerramento de um ciclo importante na minha vida. Por todo apoio dispensado nos momentos de angústia. Por todas as horas gastas escutando minhas lamentações, tristezas e alegrias, pessoais e profissionais. Por estimular e apoiar sempre o meu crescimento. Por seu meu companheiro de todas as horas. Eu amo você.

Em especial, à minha mãe Maria, por ser um exemplo de mulher e por ser responsável por tudo o que eu sou hoje. Por ter sempre priorizado os meus estudos, mesmo nos momentos

de necessidade. Por ter criado a mim e minha irmã sozinha, trabalhando arduamente como telefonista. Por ouvir sempre minhas angústias. Por todo amor...



“A doença é a zona noturna da vida, uma cidadania mais onerosa. Todos que nascem têm dupla cidadania, no reino dos sãos e no reino dos doentes. Apesar de todos preferirmos só usar o passaporte bom, mais cedo ou mais tarde nos vemos obrigados, pelo menos por um período, a nos identificarmos como cidadãos desse outro lugar.”

(Susan Sontag)

## RESUMO

A mucosite intestinal (MI) é um efeito colateral comum relacionado à quimioterapia anti-câncer baseada em irinotecano. MI cursa com diarreia intensa e afeta de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes, aumentando a morbidade e os custos com a saúde. Cerca de até 80% dos pacientes tratados com irinotecano desenvolvem algum grau de MI. A fisiopatologia deste efeito colateral não está completamente esclarecida e, infelizmente, não há um tratamento específico e efetivo. A investigação de mecanismos fisiopatológicos pode potencialmente guiar a descoberta de biomarcadores ou novas estratégias terapêuticas. Estudos anteriores apontam para o envolvimento de moléculas e células inflamatórias, tais como: óxido nítrico, COX-2, KC (análoga à IL-8 humana), TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-18 e IL-33, receptores semelhantes a toll e neutrófilos na patogênese da MI em modelos murinos. Entretanto, a participação de outras células do sistema imune inato e adaptativo, reguladas em parte por estas citocinas, ainda não foi investigada. **Objetivo:** Traçar o perfil de expressão das células Tregs, Th7, Th (não-reg e não-Th17) e linfóides inatas do tipo 3 ao longo do desenvolvimento da MI induzida por irinotecano e avaliar o papel das Tregs na patogênese. **Métodos:** C57BL/6 (20-25g) receberam salina ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia/4 dias, para indução da MI. A eutanásia ocorreu nos dias 1(D1), D3, D5 ou D7. Para depleção das Tregs os animais foram pré-tratados com ciclofosfamida (100mg/kg), 2h antes da primeira dose de irinotecano e eutanasiados no D7. Os linfócitos da lâmina própria foram isolados por digestão enzimática e gradiente de percoll e as células esplênicas por digestão mecânica. A frequência das diferentes subpopulações linfocitárias foi identificada por citometria de fluxo. No dia da eutanásia coletou-se amostra de sangue periférico para contagem de leucócitos sanguíneos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) e amostras de íleo para ensaio de MPO, dosagem de citocinas e histopatológico. **Resultados:** A MI cursou com perda ponderal ( $P < 0,05$ ), leucopenia ( $P < 0,05$ ), diarreia ( $P < 0,05$ ), lesão intestinal ( $P < 0,05$ ) e redução da razão vilo/cripta ( $P < 0,05$ ). Adicionalmente, a injeção de irinotecano induziu o aumento do %Tregs ( $P < 0,05$ ) e %Th17 ( $P < 0,05$ ), intestinais e esplênicas. A razão entre % Treg/Th17 intestinal correlacionou-se positivamente com parâmetros de gravidade, como os escores de diarreia ( $P < 0,05$ ) e histopatológicos ( $P < 0,05$ ) dos animais. Houve uma correlação negativa entre %Treg/Th17 esplênico e esses mesmos parâmetros ( $P < 0,05$ ). A depleção de Tregs agravou a MI, aumentando a perda ponderal ( $P < 0,05$ ), os escores de diarreia ( $P < 0,05$ ), a mortalidade (100%) e reduzindo a razão vilo/cripta ( $P < 0,05$ ). O número de neutrófilos intestinais

aumentou após injeção de irinotecano, com pico no D5 ( $P<0,05$ ). No D7, houve uma redução no número dessas células vs D5 ( $P<0,05$ ). Além disso, houve uma correlação negativa entre o número de neutrófilos e o %Tregs ( $P<0,05$ ). A frequência de células linfoides inatas do tipo 3 ( $P<0,05$ ) e de outras células Th, não-Treg e não-Th17 ( $P<0,05$ ), diminuiu após a injeção de irinotecano, sendo moduladas positivamente após a depleção de Tregs. Além disso, a injeção de irinotecano elevou as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-17A no intestino dos animais ( $P<0,05$ ). Com a depleção das Tregs, os níveis de KC ( $P<0,05$ ) e TNF- $\alpha$  ( $P<0,05$ ) foram potencializados, além de ocorrer uma redução de IL-10 ( $P<0,05$ ). **Conclusão:** As células Tregs são importantes para contrabalancear a inflamação na MI induzida por irinotecano.

**Palavras-chave:** Mucosite intestinal. Irinotecano. Células T regulatórias. Inflamação. Intestino.

## ABSTRACT

### DEPLETION OF TREGS AGGRAVATES IRINOTECAN-INDUCED EXPERIMENTAL INTESTINAL MUCOSITIS

Intestinal mucositis (IM) is a common side effect related to anti-cancer chemotherapy based on irinotecan. MI is characterized by severe diarrhea and significantly affects patients' quality of life, increasing morbidity and health costs. Up to 80% of irinotecan-treated patients develop some degree of MI. The pathophysiology of this side effect is not fully understood and, unfortunately, there is no specific and effective treatment. The investigation of pathophysiological mechanisms may potentially guide the discovery of biomarkers or new therapeutic strategies. Previous studies point to the involvement of inflammatory molecules and cells, such as nitric oxide, COX-2, KC (analogous to human IL-8), TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-18 and IL-33, toll-like receptors and neutrophils in the pathogenesis of MI in murine models. However, the participation of other innate and adaptive immune system cells, regulated in part by these cytokines, has not been investigated yet. **Aim:** To identify the expression profile of Tregs, Th7, Th (non-reg and non-Th17 cells) and type 3 innate lymphoid cells along the development of irinotecan-induced IM and to evaluate the role of Tregs in the pathogenesis. **Methods:** C57BL/6 (20-25g) received saline or irinotecan (75 mg/kg, i.p.), once daily/4 days, for induction of MI. Euthanasia occurred on days 1 (D1), D3, D5 or D7. For depletion of the Tregs the mice were pretreated with cyclophosphamide (100 mg/kg), 2h before the first dose of irinotecan, and euthanized on D7. Lymphocytes from intestinal lamina propria were isolated by enzymatic digestion and percoll gradient and splenic cells by mechanical digestion. The frequency of different lymphocyte subpopulations was identified by flow cytometry. On the day of euthanasia, a peripheral blood sample was collected for blood leukocyte count ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) and ileum samples for MPO, cytokine and histopathological assay. **Results:** The mice with MI had weight loss ( $P<0.05$ ), leucopenia ( $P<0.05$ ), diarrhea ( $P <0.05$ ), intestinal damage ( $P<0.05$ ) and reduction of villus/crypt ratio ( $P<0.05$ ). In addition, irinotecan injection induced the increase of the % of Tregs ( $P<0.05$ ) and % of Th17 cells ( $P<0.05$ ), intestinal and splenic. The ratio of intestinal %Treg / Th17 correlated positively with severity parameters, such as diarrhea ( $P<0.05$ ) and histopathological ( $P<0.05$ ) scores of mice. There was a negative correlation between % Treg / Th17 splenic and these same parameters ( $P<0.05$ ). Tregs depletion aggravated MI, increasing weight loss ( $P<0.05$ ), diarrhea scores ( $P<0.05$ ), mortality (100%) and reducing villus/crypt ratio ( $P<0, 05$ ). The number of intestinal

neutrophils increased after irinotecan injection, with the peak on D5 ( $P<0.05$ ). In D7, there was a reduction in the number of these cells vs D5 ( $P<0.05$ ). In addition, there was a negative correlation between the number of neutrophils and the % of Tregs ( $P<0.05$ ). The frequency of type 3 innate lymphoid cells ( $P<0.05$ ) and other Th cells, non-Treg and non-Th17 cells ( $P<0.05$ ), decreased after irinotecan injection and were positively modulated after Tregs depletion. In addition, irinotecan injection elevated TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC and IL-17A cytokines in the gut ( $P<0.05$ ). With Tregs depletion, the levels of KC ( $P <0.05$ ) and TNF- $\alpha$  ( $P<0.05$ ) were potentialized, and there was a reduction of IL-10 ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Tregs cells are important to counterbalancing inflammation in irinotecan induced-IM.

**Key words:** Intestinal mucositis. Irinotecan. Regulatory T cells. Inflammation. Intestine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Incidência estimada de câncer em homens no mundo em 2012 .....	23
Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma*.....	23
Figura 3- Estrutura da camptotecina, irinotecano e topotecano. ....	26
Figura 4- Mecanismo de ação do Irinotecano. ....	27
Figura 5- Metabolismo e recirculação entero-hepática do irinotecano. ....	28
Figura 6- Estrutura do epitélio do intestino delgado e grosso. ....	31
Figura 7- Patobiologia da mucosite. ....	33
Figura 8- Patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano. ....	37
Figura 9- Sistema imune intestinal. ....	40
Figura 10- Distribuição espacial e composição da microbiota ao longo do trato gastrointestinal.....	42
Figura 11- Estrutura dos intestinos delgado e grosso. ....	43
Figura 12- Subpopulações de células T. ....	46
Figura 13- Grupos experimentais e linha temporal. ....	55
Figura 14- Percentual de apoptose e necrose dos linfócitos após a extração do intestino. ....	60
Figura 15- Características de tamanho e granulosidade dos linfócitos intestinais e esplênicos.....	63
Figura 16- Estratégia de seleção das células Treg e Th17.....	64
Figura 17- Efeito da administração de irinotecano sobre a variação de massa corpórea, contagem de leucócitos sanguíneos, escores de diarreia e atividade de MPO. ....	69
Figura 18- Alterações histopatológicas e morfométricas decorrentes da administração de irinotecano. ....	70

Figura 19-Alterações na frequência de células CD3+ e CD3+CD4+, intestinais e esplênicas, durante o curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano. ....	73
Figura 20-Alterações na frequência de células Treg e Th17 durante o curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano. ....	74
Figura 21-Análise de correlação entre a razão %Treg/Th17 intestinal ou esplênica e parâmetros de gravidade da mucosite intestinal induzida por irinotecano. ....	75
Figura 22-Aumento na expressão de CD25 nas células Tregs intestinais dos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano. ....	78
Figura 23-Alterações na frequência de células CD3+ e CD3+CD4+, intestinais e esplênicas, após a depleção das Tregs com ciclofosfamida. ....	79
Figura 24-Depleção de células Tregs com ciclofosfamida nos animais com mucosite induzida por irinotecano. ....	80
Figura 25-Depleção de Tregs com ciclofosfamida agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano. ....	82
Figura 26-Alterações histopatológicas e morfométricas decorrentes da depleção de Tregs nos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano. ....	83
Figura 27-Percentual de células linfoides inatas do tipo 3 (ICL3) intestinais ao longo do desenvolvimento da mucosite por irinotecano e após a depleção das Tregs. ....	85
Figura 28-Correlação entre a frequência de células Tregs, Th17 e número de neutrófilos no intestino. ....	87
Figura 29-Níveis de KC, IL1-beta e IL-10 e expressão de TNF-alfa e IL-17A no intestino dos animais com mucosite depletados ou não de Tregs. ....	89
Figura 30-Frequência de células Th não-Treg e não-Th17 nos animais com mucosite intestinal depletados ou não de Tregs. ....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluoracil
7-AAD	7-aminoactinomycin D
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
APC	Allophycocyanin
APC	7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1piperidino]carbonyloxycamptothecin
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Soro Albumina Bovina
CE	Carboxilesterase
CEUA	Comissão de ética para uso de Animais
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CPT	Camptotecina
CPT-11	Irinotecano
CYC	Ciclofosfamida
DAMPS	Padões Moleculares Associados Ao Dano
DSS	Dextran Sulfato De Sódio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EROS	Espécies Reativas De Oxigênio
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato De Fluoresceína



FOLFIRI	5-Fluoracil, Leucovorin e Irinotecano
FOLFOX	5-Fluoracil, Leucovorin e Oxaliplatina
FOLFOXIRI	5-Fluoracil, Leucovorin, Oxaliplatina e Irinotecano
FOXP3	Forkhead Box P3
FSC	Forward Scatter
G-CSF	Fator Estimulador De Colônias De Granulócitos
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hCE	Carboxilesterase Hepática
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid
HTAB	Brometo De Hexadeciltrimetilamônio
IARC	International Association of Cancer Registries
IBD	Inflammatory Bowel Disease (Doença inflamatória intestinal)
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 Beta
ILC	Innate Lymphoide Cells (Células Linfóides Inatas)
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
KC	Keratinocyte Chemoattractant
LAFICA	Laboratório de Farmacologia Da Inflamação e Do Câncer
MPO	Mieloperoxidase
NF $\kappa$ B	Fator Nuclear Kappa B
NPC	7-Ethyl-10-[4-N-(1-Piperidino)-1-Amino]Carbonyloxycamptothecin
PAMPS	Padrões Moleculares Associados à Patógenos

PBS	Salina Tamponada Com Fosfato
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PGE2	Prostaglandina E2
ROR- $\gamma$ t	Retinoid-Related Orphan Receptor Gamma t
SN-38	7-Etil-10-Hidroxicamptotecina
SN38G	SN38 Glucuronídeo
SSC	Side Scatter
TGF- $\beta$	Fator Transformador Do Crescimento- Beta
Th	T helper
TLRs	Receptores Semelhantes A Toll
TMB	Tetrametilbenzidina
TNBS	Ácido Trinitrobenzenosulfônico
TNF- $\alpha$	Fator De Necrose Tumoral Alfa
TOPO I	Topoisomerase I
Tregs	Células T Regulatórias
UGT1A1	Polipeptídeo A1 da Família Da Uridina Difosfato Glicosiltransferase 1
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
1.1 O Câncer.....	22
1.1.1 Definição.....	22
1.1.2 Epidemiologia.....	22
1.1.3 Câncer colorretal.....	24
1.2 Irinotecano.....	25
1.3 Mucosite Alimentar.....	29
1.3.2 Fisiopatologia da mucosite alimentar .....	30
1.3.2 Fisiopatologia da mucosite intestinal por irinotecano .....	33
1.4 O sistema imune da mucosa gastrointestinal .....	37
1.5 Subpopulações de células T regulatórias e Th17 .....	44
1.5.1 O eixo Treg/Th17 nas doenças inflamatórias intestinais .....	46
1.6 A ciclofosfamida como ferramenta farmacológica para depleção de Tregs .....	48
2 JUSTIFICATIVA .....	50
3 PERGUNTAS DE PARTIDA E HIPÓTESES .....	51
4. OBJETIVOS .....	52
4.1 Geral.....	52
4.2 Específicos .....	52
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
5.1 Animais .....	53
5.2 Aspectos éticos.....	53
5.3 Drogas .....	54
5.4 Indução da mucosite intestinal experimental .....	54
5.5 Depleção das células T regulatórias com ciclofosfamida .....	54
5.6 Parâmetros de avaliação da indução da mucosite intestinal.....	55
5.7 Isolamento dos linfócitos da lâmina própria intestinal.....	58

5.8 Isolamento dos linfócitos esplênicos.....	60
5.9 Imunofenotipagem das subpopulações de células Treg e Th17 por citometria de fluxo	60
5.10 Estratégia de seleção (gate) das subpopulações linfocitárias.....	62
5.11 Ensaio imunoenzimático para quantificação de citocinas (ELISA).....	64
5.12 Western Blot para dosagem de citocina.....	65
5.13 Expressão do RNA mensageiro para IL-17A por PCR em tempo real.....	66
5.14 Síntese esquematizada do protocolo experimental e linha temporal.....	55
5.15 Análise estatística.....	66
6. RESULTADOS.....	67
6.1 Cinética de indução da mucosite experimental por irinotecano.....	67
6.2 Frequência de células Treg e Th17 no intestino e baço dos animais ao longo do desenvolvimento da mucosite intestinal.....	71
6.3 Células Tregs intestinais regulam positivamente a expressão de CD25 no sétimo dia de desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	76
6.4 Baixa dose de ciclofosfamida ocasiona depleção das células T regulatórias intestinais e esplênicas. ....	76
6.5 A depleção das células Tregs com ciclofosfamida agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	81
6.6 Frequência de células linfoides inatas do tipo 3 (ICL3) no intestino dos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano, depletados ou não de Tregs.....	84
6.7 Correlação entre a frequência de Tregs ou células Th17 intestinais com número de neutrófilos teciduais. ....	86
6.8 Níveis das citocinas KC, IL-1 $\beta$ e IL-10 por ELISA, expressão de TNF- $\alpha$ por western blot e do mRNA para Il-17A no intestino dos animais com mucosite depletados ou não de Tregs.....	88
6.9 Frequência de outras células T helper, não-Treg e não-Th17, no intestino dos animais com mucosite induzida por irinotecano. ....	90
7. DISCUSSÃO.....	92
8. CONCLUSÕES.....	106

9. PESPECTIVAS .....	107
REFERÊNCIAS .....	108
ANEXO A .....	126

## 1. INTRODUÇÃO

“Males que crescem desesperadamente. Só podem ser aliviados com mecanismos desesperados” (William Shakespeare, Hamlet).

### 1.1 O Câncer.

#### 1.1.1 Definição

O câncer é o termo utilizado para definir um conjunto de doenças complexas e potencialmente letais que compartilham uma característica fundamental: a proliferação celular anormal descontrolada e a capacidade de invadir tecidos adjacentes (MUKHERJEE, 2012; BRASIL, 2012; WHO, 2015). A sua etimologia vem da palavra grega *Karkínos*, que significa caranguejo, em alusão à semelhança entre a disposição dos vasos sanguíneos circunjacentes ao tumor e as patas do caranguejo (SILVA; AQUINO; SANTOS, 2008; BRASIL, 2012).

Apesar de a palavra câncer ter sido utilizada pela primeira vez por Hipócrates, que viveu entre 460 e 377 a.C., há relatos da doença em um texto egípcio datado de 2500 a.C.: “um tumor saliente no peito [...] como tocar uma bola de papel” (MUKHERJEE, 2012; BRASIL, 2012).

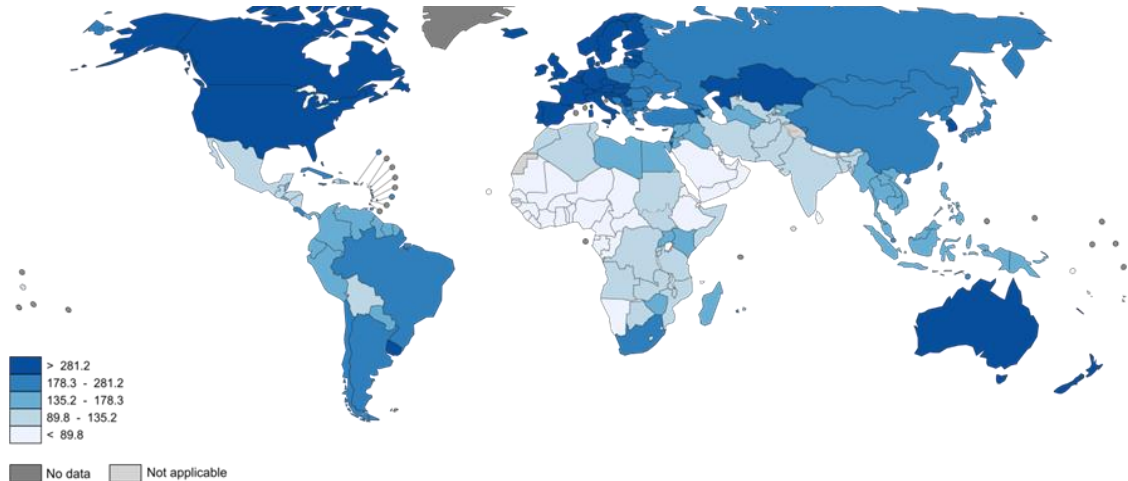
#### 1.1.2 Epidemiologia

É inquestionável que o câncer é um importante problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento. Estes países serão responsáveis por 80% dos 20 milhões de casos novos da doença estimados para 2025. A doença representa a segunda causa de morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (WHO, 2015). Em 2015, segundo a organização mundial de saúde, 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer no mundo, 1 em 6 de todas as mortes globais (WHO, 2017).

Segundo a associação internacional de registros de câncer (IACR- International Association of Cancer Registries), por meio do projeto GLOBOCAN, os tipos de cânceres mais incidentes no mundo em 2012 foram: pulmão, mama, intestino e próstata, respectivamente (GLOBOCAN/IACR, 2012; BRASIL, 2015). A figura 1 aponta a incidência estimada de câncer para 2012 nos diferentes países em homens. Nas mulheres,

a estimativa é semelhante. Podemos observar a elevada incidência da doença no Brasil e demais países em desenvolvimento.

Figura 1- Incidência estimada de câncer em homens no mundo em 2012



Fonte: World Health Organization (2015).

No Brasil, estimam-se 600 mil casos novos de câncer para o biênio 2016-2017. No ano de 2016, excluindo os cânceres de pele não-melanoma, as estimativas apontaram o câncer de próstata como o mais incidente no país em homens (28,6%) e o câncer de mama em mulheres (28,1%) (BRASIL, 2015). Estes dados, e os de incidência estimada para outros tipos de câncer, estão demonstrados na figura 2.

Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma\*.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens	Mulheres	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Ministério da Saúde (2015).

### ***1.1.3 Câncer colorretal.***

O câncer colorretal é o terceiro tipo mais comum em homens e o segundo em mulheres. Em 2012 a incidência estimada foi de 1,4 milhões de casos no mundo, com 693, 900 mortes, quase 50% de mortalidade. Apesar disto, o número de óbitos vem diminuindo em um grande número de países em decorrência do rastreamento para identificação de lesões precussoras, por meio da pesquisa de sangue oculto nas fezes e colonoscopia, e melhoria no tratamento (BRASIL, 2015; WHO, 2015).

No Brasil, as estimativas para o biênio 2016-2017 apontam 16.660 casos novos de câncer de cólon e reto para cada 100 mil homens e 17.620 para cada 100 mil mulheres. Na região Nordeste, esse tipo de câncer ocupa a quarta posição nos homens e a terceira nas mulheres. Estimam-se 800 casos novos da doença para o ano de 2016 no estado do Ceará, onde destes, a metade é proveniente da cidade de Fortaleza (BRASIL, 2015).

Os estágios iniciais da doença são normalmente assintomáticos, por isso o rastreamento inicial adequado é importante. Nos estágios mais avançados a doença pode cursar com sangramento retal, presença de sangue nas fezes, alterações nos hábitos intestinais e consistência das fezes, dor abdominal, anorexia e perda de peso. A perda de sangue pode, nos casos mais graves, ocasionar anemia, com sintomas como fadiga e fraqueza excessiva (BRASIL, 2015; WHO, 2015)

O risco para o desenvolvimento do câncer colorretal aumenta com a idade, com a presença de história familiar ou pessoal de câncer colorretal e /ou pólipos, e história pessoal de doença inflamatória crônica. Entretanto, vários fatores podem ser modificáveis, como obesidade, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo, elevado consumo de carne e alimentos processados, baixa ingestão de cálcio e de alimentos ricos em fibras, frutas e vegetais. A utilização regular de anti-inflamatórios não esteroidais, como aspirina, está associada ao menor risco para desenvolvimento da doença (WHO, 2015; BRASIL, 2015).

A maioria dos casos de câncer colorretal surge a partir de adenomas esporádicos e pólipos adenomatosos, uma massa discreta que protui na luz intestinal. O tratamento é geralmente cirúrgico para remoção da área afetada e linfonodos adjacentes. A depender da extensão tumoral o tratamento quimioterápico e/ou radioterápico adjuvante pode ser necessário (WHO, 2015; BRASIL, 2015).



O câncer colorretal metastático, diferentemente do não metastático, tem a quimioterapia citotóxica como a principal forma de tratamento e, apesar dos avanços terapêuticos terem proporcionado uma melhoria na sobrevida dos pacientes, possui ainda elevadas taxas de mortalidade, com uma sobrevida média variando de 20 a 36 meses (HAGGAR; BOUSHEY, 2009; LEAL; FERREIRA; SASSE, 2017).

Durante décadas as fluoropirimidinas, como 5-fluoracil (5-FU), foram as drogas de escolha para o tratamento do câncer colorretal metastático. Em meados do ano 2000, um estudo clínico realizado em 13 países europeus apontou a combinação de irinotecano com 5-FU como primeira linha de tratamento (DOUILLARD *et al.*, 2000). A incorporação de novos agentes citotóxicos, como irinotecano e oxaliplatina, e de terapias alvo à monoterapia com 5-FU, aumentou a sobrevida dos pacientes de cerca de 12 para 30 meses (FAKIH, 2015).

Atualmente, os tratamentos de primeira linha para o câncer colorretal metastático incluem a combinação de agentes citotóxicos em diferentes protocolos: 5-FU, leucovorin e irinotecano (FOLFIRI); 5-FU, leucovorin e oxaliplatina (FOLFOX); campecitabina e oxaliplatina (XELOX); bem como 5-FU, leucovorin, oxaliplatina e irinotecano (FOLFOXIRI) (FAKIH, 2015). É inquestionável a melhora nas taxas de resposta e sobrevida global obtidas com a combinação desses agentes em oposição à monoterapia com 5-FU. Entretanto, a eficácia terapêutica tem sido limitada pelo surgimento de efeitos colaterais que afetam de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes, podendo ocasionar a redução ou a interrupção da quimioterapia. Taxas elevadas de toxicidade têm sido observadas nos pacientes em uso de quimioterapia combinada com irinotecano, especialmente diarreia e neutropenia. Díaz *et al.*, 2006, em estudo retrospectivo que incluiu 142 pacientes com câncer colorretal metastático, tratados entre os anos de 1996 e 2004 em um centro de referência na Espanha, encontrou 50,7% de toxicidade graus 3 e 4 em regimes que incluem irinotecano e/ou oxaliplatina. Destes, 23,2% tiveram o tratamento interrompido. A toxicidade mais presente neste estudo foi a digestiva, especialmente a diarreia (22,1%).

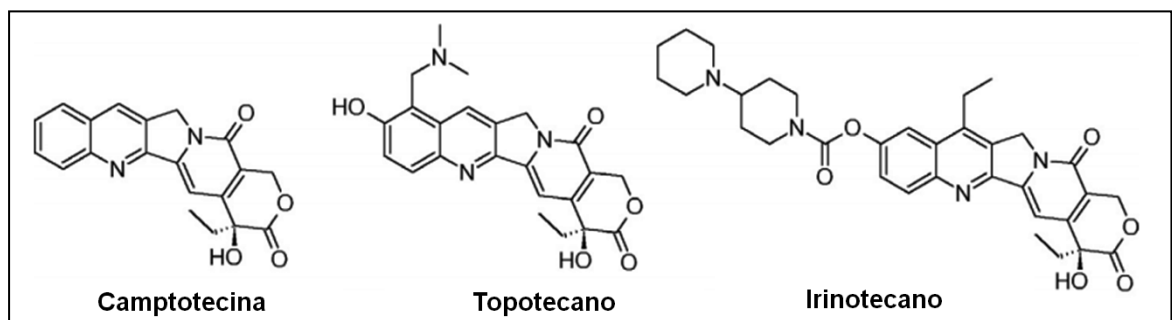
## 1.2 Irinotecano

O irinotecano (CPT-11) é um derivado semi-sintético da camptotecina (CPT). Esta foi inicialmente isolada em 1966 por Wall e Wani, a partir da casca da árvore *Camptotheca acuminata*, também chamada de árvore feliz chinesa, durante uma

investigação de várias espécies de plantas para isolamento de novos esteroides. Na medicina tradicional chinesa a planta era utilizada como um remédio natural contra o câncer, o que de fato foi confirmado posteriormente, com testes *in vitro* e em modelos murinos de leucemia (WALL *et al.*, 1966; MARTINO *et al.*, 2017). Apesar do seu mecanismo de ação não estar completamente esclarecido na época, a camptotecina foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para ensaios clínicos com câncer de cólon em meados de 1970 (GOTTLIEB *et al.*, 1970; MOERTEL *et al.*, 1972; MARTINO *et al.*, 2017). Embora tenha apresentado forte efeito antitumoral em pacientes com cânceres gastrointestinais, a ocorrência de efeitos adversos severos e imprevisíveis resultou na descontinuação do seu uso em estudos de fase II, em 1972 (MARTINO *et al.*, 2017). Na década de 80, a enzima topoisomerase I foi identificada como alvo da camptotecina, apontando para o seu mecanismo de ação antitumoral (HSIANG *et al.*, 1985; HSIANG; LIU, 1988).

A baixa solubilidade e estabilidade *in vivo* da camptotecina estimulou a produção de derivados sintéticos e semi-sintéticos solúveis em água, no final de 1980 e início dos anos 90 (WALL *et al.*, 1993; VENDITTO; SIMANEK, 2010). Apesar de um grande número de moléculas terem sido produzidas apenas duas foram aprovadas para uso clínico: o irinotecano e topotecano (MARTINO *et al.*, 2017). Na figura 3, podemos observar a estrutura química da camptotecina, do irinotecano e do topotecano.

Figura 3- Estrutura da camptotecina, irinotecano e topotecano.



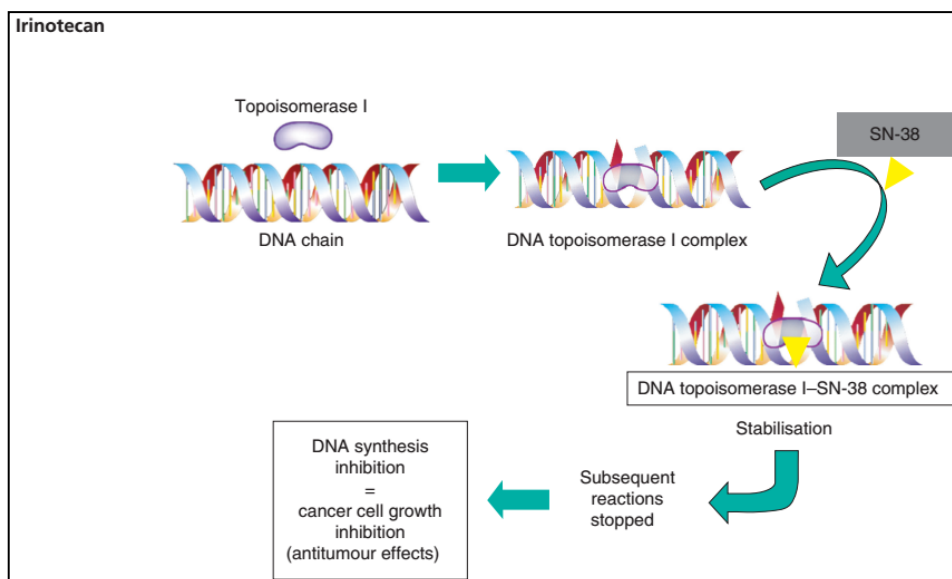
Fonte: Martino *et al.* (2017).

O irinotecano tornou-se comercialmente disponível no Japão em 1994, indicado para o tratamento de câncer de pulmão, colo de útero e ovário. Um ano depois foi aprovado na Europa para uso em câncer de cólon. Em 1996 foi aprovado nos EUA para tratamento

do câncer colorretal. Em combinação com 5-FU e leucovorin é, atualmente, a primeira linha de tratamento para câncer de cólon e reto (MARTINO *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação antitumoral do irinotecano (Figura 4) se dá por meio da inibição seletiva da enzima topoisomerase I (Topo I), envolvida na replicação, transcrição, recombinação e reparo da cadeia de DNA. A topo I atua no relaxamento da supertorção gerada durante a fase de replicação e transcrição do DNA, cortando uma das fitas para o seu relaxamento. A sua inibição pelo irinotecano e metabólito, SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), se dá durante a fase S do ciclo celular (SATO *et al.*, 2008; MARTINO *et al.*, 2017). A sensibilidade das células tumorais ao irinotecano é determinada por vários fatores, dentre eles: permeabilidade de membrana celular, nível de expressão da enzima topo I, mutações no gene da topo I e mudanças na regulação do ciclo celular (KOHN; POMMIER, 2000).

Figura 4- Mecanismo de ação do Irinotecano.

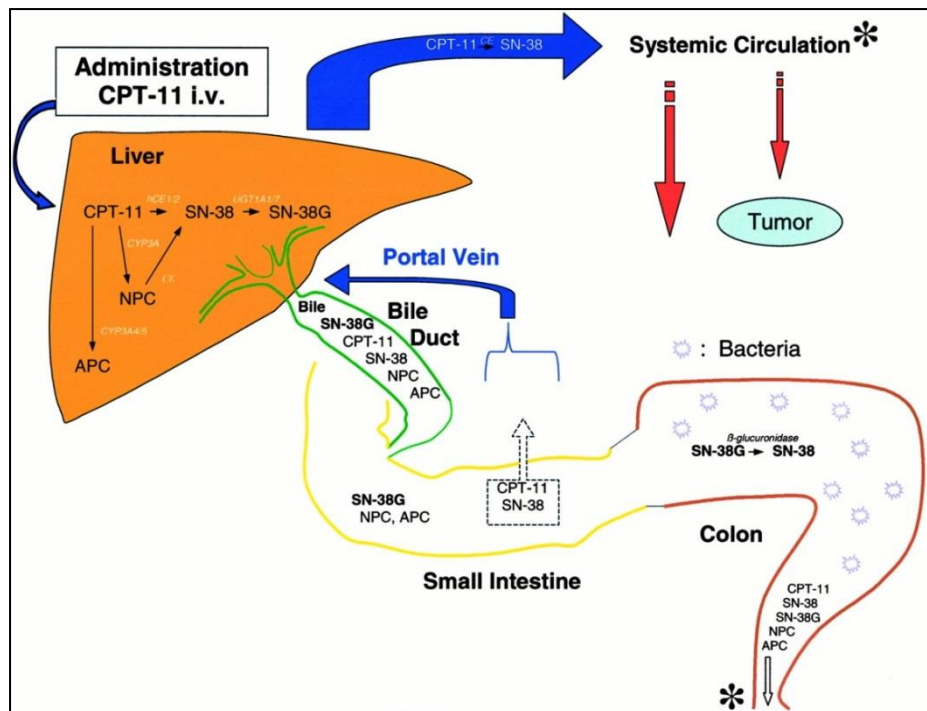


Fonte: Sato *et al.* (2008).

O irinotecano é uma pró-droga com baixa atividade antitumoral *per se* que é convertida em seu metabólito ativo e altamente citotóxico, SN-38, pela enzima carboxilesterase hepática (CE) (Figura 5), presente no fígado, plasma, intestino e tecidos tumorais. O SN-38 é cerca de 1000 vezes mais potente que o irinotecano na inibição da enzima topo I. Ainda no fígado, o polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1) realiza a inativação do SN38 a SN38 glicuronídeo (SN38G), sem atividade citotóxica. O irinotecano, SN38 e SN38G chegam ao intestino

através da bile. No intestino, SN38-G pode ser convertido em SN-38 pela ação  $\beta$ -glicuronidasas produzidas por bactérias intestinais e o irinotecano pode ser convertido em SN-38 por CE intestinais. O irinotecano e SN-38 podem ser reabsorvidos a partir do intestino, onde retornam ao fígado pela veia porta, em um processo denominado recirculação entero-hepática (KEHRER *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2008; MARTINO *et al.*, 2017).

Figura 5- Metabolismo e recirculação entero-hepática do irinotecano.



Fonte: Kehrer *et al.* (2001).

No fígado, o irinotecano (CPT-11) pode ser metabolizado pelas carboxilesterases hepática 1 e 2 (hCE) a SN-38. Este, por sua vez, depurado pela UGT1A1/7 a glicuronídeos de SN-38 (SN38G), desprovido de atividade biológica. Sob ação da enzima CYP3A4, o CPT-11 é também convertido nos seus metabólitos inativos: APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin) e NPC (7-ethyl-10-[4-N-(1-piperidino)-1-amino]carbonyloxycamptothecin). O APC pode ser metabolizado pela hCE, formando mais SN-38. Todos esses compostos ativos e inativos são excretados na bile e chegam ao intestino delgado. O irinotecano pode ser clivado no intestino a SN-38 pela ação de CE intestinais (não demonstrado na figura). O SN-38G pode ser desconjugado a SN-38 por meio de  $\beta$ -glicuronidasas bacterianas, presentes em abundância na porção mais distal do intestino. O irinotecano e SN-38 podem ser reabsorvidos a partir do intestino, onde retornam ao fígado pela veia porta, em um processo denominado recirculação entero-hepática.

A manutenção de níveis elevados de SN-38 no intestino, em parte mediada pela desconjugação do SN-38G por  $\beta$ -glicuronidases bacterianas, está relacionada à toxicidade intestinal atribuída ao tratamento com irinotecano. A mucosite gastrointestinal e diarreia estão entre os efeitos colaterais mais comuns relacionados ao irinotecano (GUPTA *et al.*, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2016).

### 1.3 Mucosite Alimentar

A mucosite alimentar é um dos efeitos colaterais mais comuns associados à quimioterapia. Pode ser definida como uma lesão dolorosa, inflamatória e/ou ulcerativa, que pode afetar a mucosa oral e/ou gastrointestinal, de maneira global ou localizada (VILA; SONIS, 2015; KWON, 2016; GRABENBAUER; HOLGER, 2016). Os sinais e sintomas incluem dor, ulceração, náuseas, vômitos, sangramento, constipação e diarreia; decorrentes da inflamação e lesão na mucosa do trato gastrointestinal (MAYO *et al.*, 2017). Ocasionalmente, a mucosite pode ser fatal, especialmente a induzida por irinotecano (BOWEN *et al.*, 2006).

Cerca de 40% dos pacientes em regimes quimioterapia convencionais e até 60% daqueles que receberam doses mais elevadas desenvolvem mucosite. Os fármacos antineoplásicos mais comumente relacionados a esse efeito colateral são: irinotecano, 5-FU, taxanes e campecitabina. Em ensaios clínicos, a incidência de mucosite chega até 80% nos pacientes que receberam o irinotecano, sendo a diarreia o sintoma mais comum (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006).

A classificação da mucosite é realizada por meio de escores, atribuídos de acordo com a intensidade da diarreia, necessidade de hidratação e hospitalização, variando de 1 a 5: *1- aumento de até 4 evacuações ao dia; 2- Aumento de 4 a 6 evacuações ao dia, indicação de hidratação venosa por tempo inferior a 24h; 3- aumento maior ou igual a 7 evacuações por dia, incontinência, hidratação venosa por tempo superior a 24 horas e hospitalização; 4- risco à vida; 5- morte.*

A maioria dos pacientes desenvolve mucosite no primeiro ciclo de quimioterapia, como demonstrado por Keefe *et al.*, 2014. Neste estudo, aos autores relataram uma ocorrência de 50-89% de diarreia moderada a grave, ao avaliar a incidência de mucosite em pacientes com câncer colorretal recebendo diferentes protocolos de

quimioterapia, FOLFIRI e FOLFOX. A diarreia foi mais intensa naqueles pacientes que receberam o protocolo FOLFIRI, que inclui o irinotecano.

O tratamento da mucosite intestinal se faz basicamente por meio do controle da diarreia. A loperamida, opióide não analgésico que reduz a motilidade intestinal, é, frequentemente, o fármaco de primeira escolha. Quando utilizada em altas doses, é capaz de controlar episódios diarreicos atribuídos ao tratamento com irinotecano. Entretanto, para as formas mais graves, graus 3 e 4, a loperamida é ineficaz (GINSON; KEEFE, 2006).

A mucosite representa um efeito colateral dose-limitante e dispendioso da quimioterapia antineoplásica, afetando de forma significativa a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes. Em até 50% dos casos, a intensidade, duração e eficácia do tratamento podem ser modificadas negativamente pelo desenvolvimento da mucosite (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006). Além do seu impacto clínico, estima-se que a mucosite aumente de forma considerável os custos com a saúde. Um estudo realizado no Canadá apontou um incremento de até 8 mil dólares, por paciente com câncer colorretal em uso de protocolo baseado em irinotecano, decorrente da diarreia secundária à quimioterapia (CARLOTTO *et al.*, 2013 apud DRANITSARIS *et al.*, 2005). Esses custos estão relacionados ao maior risco de infecções, internações hospitalares e necessidade de terapias de suporte ao paciente. Diante disto, a prevenção, redução e predição da mucosite poderiam reduzir de forma significativa os custos com a saúde e a morbimortalidade do paciente oncológico (SEBILLE *et al.*, 2015).

### ***1.3.2 Fisiopatologia da mucosite alimentar***

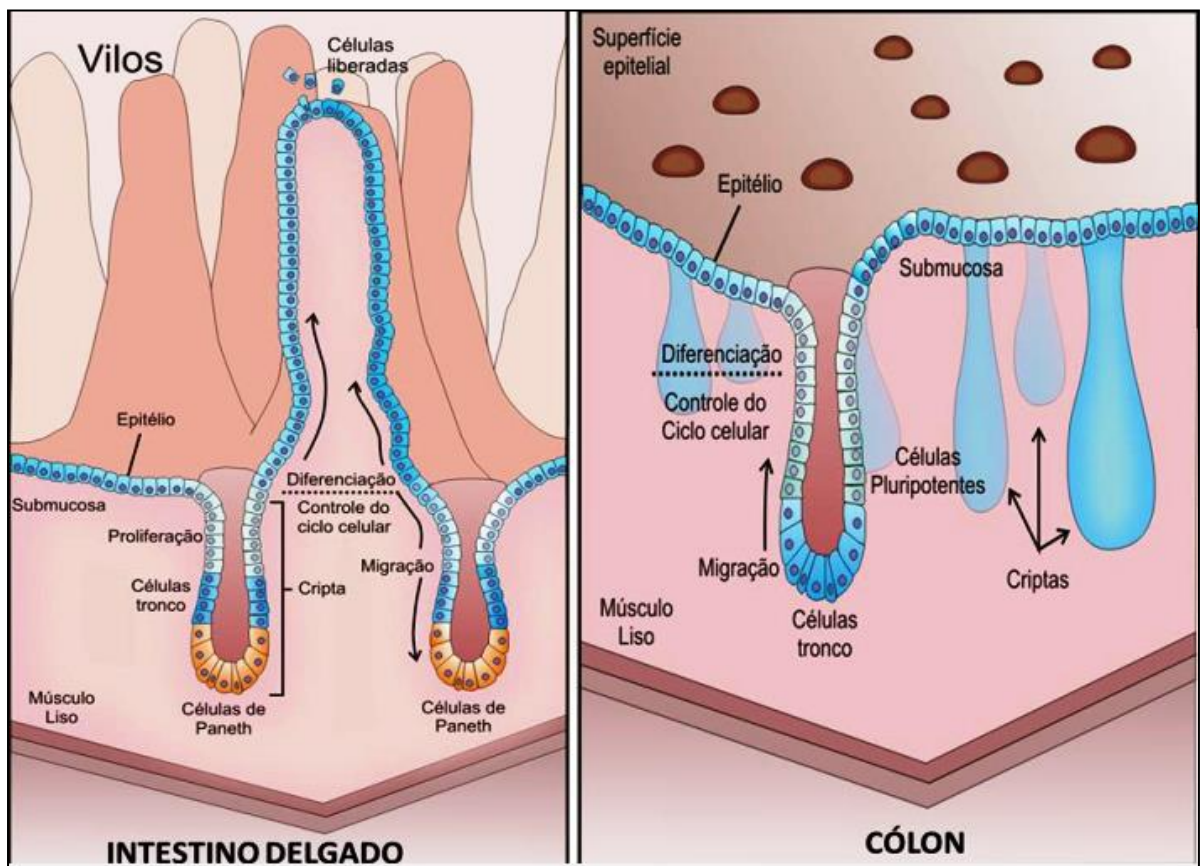
#### ***1.3.2.1 O intestino como órgão susceptível ao dano***

A mucosa intestinal é a camada mais complexa do intestino, estruturalmente e funcionalmente, sendo envolvida em funções absorptivas e de barreira. É formada basicamente por 3 camadas: a monocamada epitelial colunar, lâmina própria e muscular da mucosa (TURNER *et al.*, 2009; JALADANKI; WANG, 2011).

O epitélio intestinal é um dos tecidos corporais com maior taxa de replicação (POTTEN *et al.*, 1990 apud BOWEN *et al.*, 2006), por isto, torna-se muito susceptível ao efeito citotóxico de agentes que atuam na fase de duplicação celular, como é o caso do irinotecano. Nas criptas, células epiteliais estão em constante proliferação e renovação, e migram ao longo do vilão na direção do lúmen intestinal (Figura 6). No intestino delgado a

proliferação celular é especialmente mais rápida do que no intestino grosso, com a ocorrência de uma divisão celular a cada 5 minutos, em camundongos (POTTEN *et al.*, 1992 apud BOWEN *et al.*, 2006). O intestino delgado por inteiro é renovado a cada 2 a 3 dias em roedores e a cada 5 a 6 dias em humanos (WESTCARR *et al.*, 1999 apud BOWEN *et al.*, 2006), contrariamente do intestino grosso que possui uma taxa de renovação 2 a 4 vezes mais lenta (POTTEN *et al.*, 1992 apud BOWEN *et al.*, 2006). As quatro linhagens de células diferenciadas presentes no epitélio da mucosa intestinal são: células entero endócrinas, enterócitos, células de Paneth e células caliciformes (POTTEN *et al.*, 1990 apud BOWEN *et al.*, 2006).

Figura 6- Estrutura do epitélio do intestino delgado e grosso.



Fonte: Wong (2013).

As células epiteliais intestinais estão em constante e intensa proliferação. Células tronco estão localizadas na porção inferior das criptas e são pluripotentes, dando origem a todas as linhagens de células diferenciadas do epitélio, como as células de Paneth por exemplo. As células filhas migram na direção da luz intestinal no intestino delgado e grosso. As células mais senescentes destacam-se do epitélio e são extrusadas para o lúmen.

As diferenças na taxa de proliferação epitelial entre intestino delgado e grosso poderiam justificar, pelo menos em parte, a maior susceptibilidade do intestino delgado aos efeitos citotóxicos de antineoplásicos como o irinotecano.

### 1.3.2.2 A diarreia como principal sintoma

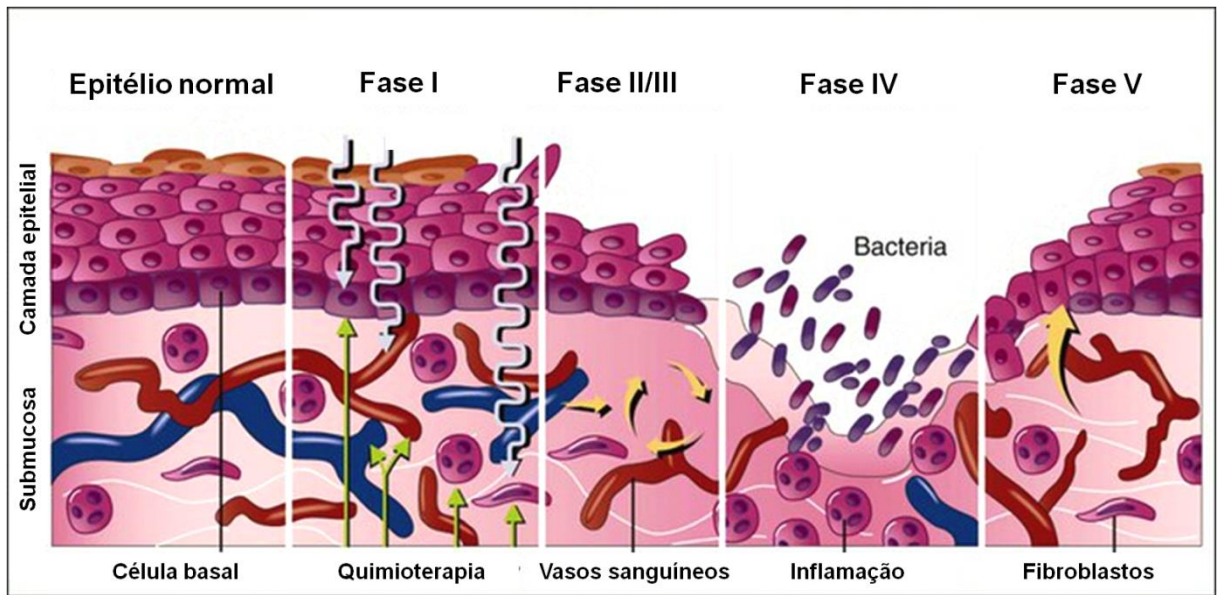
A diarreia decorrente da administração do irinotecano pode ser dividida, conforme estudo realizado em murinos, em duas fases, uma inicial e a tardia. A diarreia inicial ocorre em até 24 horas após a administração do irinotecano, está associada com a estimulação colinérgica e pode ser prevenida com uso de atropina profilaticamente. A segunda fase da diarreia ocorre mais tardiamente, principalmente entre o sexto e décimo dia após a administração do irinotecano (TRIFAN *et al.*, 2002).

A fisiopatologia da mucosite intestinal, especialmente da diarreia de fase tardia não está completamente esclarecida. Muitos avanços têm sido feitos neste aspecto, em parte com a contribuição do laboratório de farmacologia da inflamação e do câncer (LAFICA) que vem investigando nos últimos anos os mecanismos fisiopatológicos associados à mucosite intestinal induzida pela quimioterapia (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2008.; SOARES *et al.*, 2011; LEITÃO *et al.*, 2011; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015).

De acordo com Bowel *et al* (2006), o modelo da fisiopatologia em 5 fases, descrito para mucosite oral por Sonis em 2004, pode aplicado para mucosite intestinal, considerando que o trato alimentar é uma estrutura só embrionicamente. As 5 fases são: 1- iniciação; 2- *upregulation* e mensagem; 3- sinalização e amplificação; 4- ulceração e inflamação; 5- Cura. Brevemente, a fase 1 consiste na iniciação do dano gerado pela radio ou quimioterapia, com produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). As fases 2 e 3 consistem na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB), levando à expressão de muitos genes, como de citocinas pró-inflamatórias, que ativam ainda mais NFkB. A fase 4, ulcerativa, cursa com colonização bacteriana e produção de mais citocinas inflamatórias, o que amplifica a inflamação e o dano. Por fim, a fase de cura ocorre como consequência da proliferação e diferenciação epitelial e restabelecimento da microbiota local. A figura 7 ilustra essas etapas.



Figura 7-Patobiologia da mucosite.



Fonte: Adaptada de Perterson (2006).

Apesar da origem embrionária semelhante entre a boca e intestino, o que, segundo Bowel *et al* (2006), permite a estrapolação do modelo da fisiopatologia da mucosite oral proposta por Sonis para mucosite intestinal, algumas ressalvas devem ser feitas com relação a isto. O modelo proposto por Sonis (2004) não considera o papel da microbiota na patogênese da mucosite. Sabe-se, entretanto, que a microbiota, abundante no intestino, pode influenciar as 5 fases de desenvolvimento da mucosite por meio da influência sobre o processo inflamatório, o estresse oxidativo, a permeabilidade intestinal, a composição da camada de muco, o reparo epitelial e sobre a resposta imune (VAN VLIET *et al.*, 2010).

Além disso, a depender do quimioterápico utilizado pode haver diferenças nos mediadores envolvidos na amplificação do dano. O tópico seguinte dará ênfase aos aspectos envolvidos na fisiopatologia da mucosite intestinal ocasionada por irinotecano.

### ***1.3.2 Fisiopatologia da mucosite intestinal por irinotecano***

Com intuito de compreender e elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano, modelos experimentais, utilizando ratos e camundongos, foram criados. O primeiro trabalho na literatura utilizando um desses modelos foi o de Araki *et al.*, em 1993. Neste estudo, os autores utilizaram camundongos atímicos BALB/C, com administração diária de 50mg/kg de irinotecano, e observaram colite hemorrágica intensa no quinto e sétimo dia após administrações

consecutivas. Poucos anos depois, Ikuno *et al.*, em 1995, adaptou o protocolo de Araki *et al.*, ao utilizar camundongos ICR, *outbred* albinos e livres de patógenos específicos, administrando 100mg/kg de irinotecano uma vez ao dia por 4 dias consecutivos, com tempo médio de 6 dias após a primeira dose para o surgimento de diarreia.

O LAFICA utiliza atualmente o protocolo, adaptado para suas condições experimentais, de 75mg/kg/dia de irinotecano, por 4 dias consecutivos, em camundongos swiss ou C57BL/6, sendo a eutanásia realizada no quinto ou sétimo dia. Neste modelo, os animais apresentam pronunciada diarreia e dano intestinal, com encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas, redução da razão vilo-cripta, vacuolização epitelial, hiperplasia de células caliciformes e intenso infiltrado celular (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2016). A utilização de modelos experimentais permitiu a investigação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mucosite intestinal.

É inquestionável o papel de diversos mediadores inflamatórios neste modelo. Trifan *et al.*, 2002, demonstrou o aumento de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina E2 (PGE2) no cólon dos ratos com mucosite por irinotecano, com pico no quinto dia após a primeira administração. O tratamento com celecoxib reduziu a severidade da diarreia, sugerindo o envolvimento da COX-2 na patogênese da mucosite. Melo *et al.*, 2008, demonstrou que a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos swiss cursa com aumento da atividade tecidual da enzima mieloperoxidase (MPO) e níveis aumentados de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), IL1- $\beta$  (interleucina-1 beta) e KC (keratinocyte chemoattractant). A administração diária de talidomida ou pentoxifilina reduziu a expressão desses parâmetros inflamatórios e o dano intestinal. Apenas a pentoxifilina foi capaz de reduzir os escores de diarreia, tendo em vista que modula a produção de várias citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  e IL-8 e não apenas de TNF- $\alpha$  como a talidomida. Alguns anos mais tarde, Lima-Júnior *et al.*, 2012, demonstrou o papel do óxido nítrico da fisiopatologia da mucosite induzida por irinotecano, utilizando camundongos C57BL/6. O pré-tratamento com aminoguanidina, um inibidor seletivo de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ou a deleção gênica de *iNos* foi capaz de reduzir a atividade de MPO (mieloperoxidase), a hiper-contratilidade do músculo liso e a diarreia.

Sabe-se, atualmente, que espécies reativas de oxigênio podem induzir inflamação por ativação de um complexo citoplasmático multi-proteico denominado

inflamassoma (CASSEL *et al.*, 2008; ARIFA *et al.*, 2014). Os receptores semelhantes a NOD (NLR), que compõem o inflamassoma, reconhecem moléculas associadas ao dano e ativam caspase-1. Esta, por sua vez, cliva a pró-IL1 $\beta$  e pró-IL-18 para suas formas funcionais (Schroder *et al.*, 2010; ARIFA *et al.*, 2014). Tendo em vista essas observações, além do notório papel de EROS na mucosite, Lima-Júnior *et al.*, 2014, avaliou o envolvimento da IL-18 e caspase-1 em camundongos com mucosite intestinal por irinotecano. A deleção gênica para IL-18 ou caspase-1 e o tratamento de animais selvagens com IL-18bp, um inibidor natural de IL-18, preveniu o desenvolvimento da diarreia, o aumento nos níveis de MPO e a imunomarcagem para iNOS.

No mesmo ano, Guarabira *et al.*, 2014, demonstrou o papel crítico da IL-33, uma citocina da família da IL-1 juntamente com IL-1 e a IL18, na mucosite por irinotecano em camundongos BALB/c. A produção de IL-33 mostrou-se elevada no intestino dos animais, mas não a nível sistêmico. Animais knockout para o receptor da IL-33, ST2, apresentaram mucosite mais branda, enquanto que a administração de IL-33 sistêmica agrava todos os parâmetros inflamatórios e induz maior dano.

Paralelamente, Wang *et al.*, 2014, demonstrou o envolvimento da IL-1 na patogênese da mucosite por irinotecano. Utilizando o antagonista da IL-1, os autores evidenciaram que o pré-tratamento dos camundongos com IL1Ra foi capaz de reduzir a incidência, duração e gravidade da diarreia, por meio da redução da apoptose das criptas intestinais.

Diante da elucidação do envolvimento de DAMPS (padrões moleculares associados ao dano) na patogênese da mucosite, Wong *et al.*, 2015, investigou o papel dos receptores de reconhecimento de padrão TLR2 e TLR9; e da proteína adaptadora MyD88, envolvida na via de sinalização desses receptores. A deleção gênica para TLR2 ou MyD88 em camundongos C57BL/6 controlou os sinais de injúria intestinal. Em contraste, a deleção do TLR9 agravou a mucosite. Além disso, os animais selvagens tratados com irinotecano apresentaram translocação bacteriana sistêmica e hepática, o que sugere o envolvimento de padrões moleculares associados patógenos (PAMPs) nesse modelo.

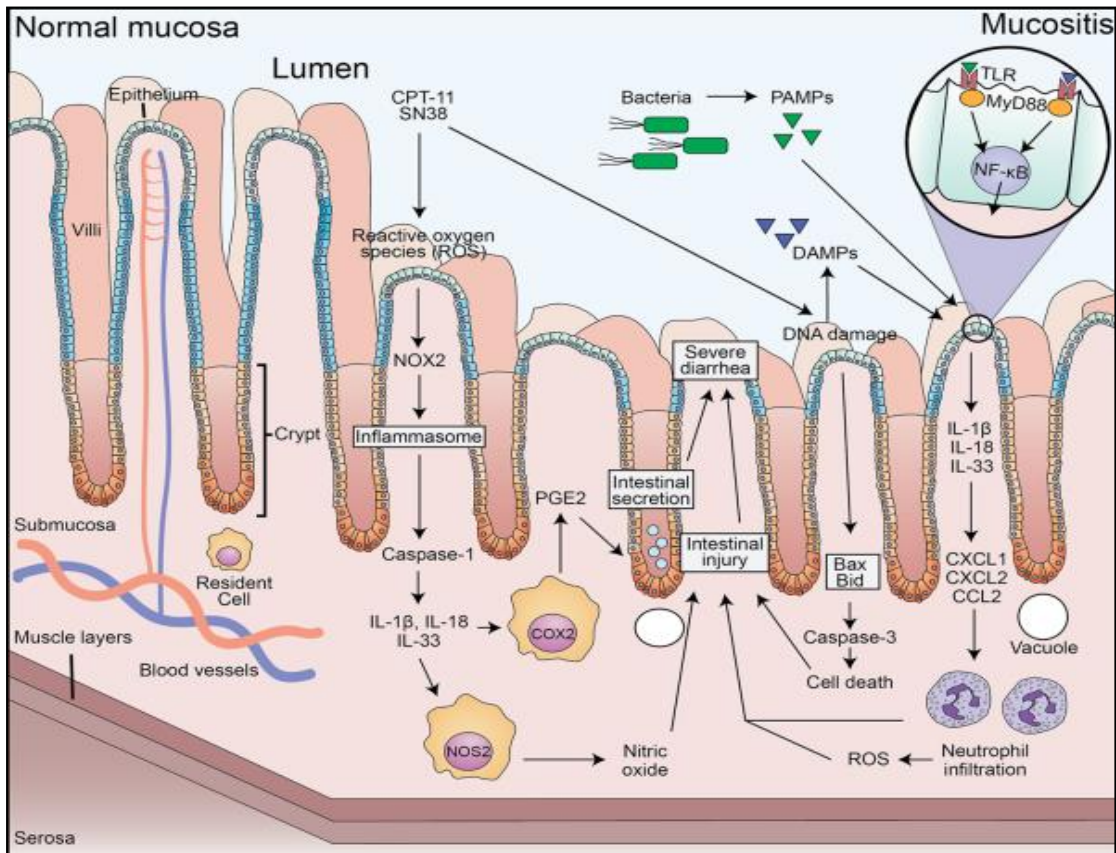
Alterações na microbiota intestinal estão presentes em pacientes em quimioterapia, com um decréscimo de Bifidobactérias e Clostridium cluster XIVa e aumento de Enterobacteriaceae e Bacteróides. Essas alterações podem estar relacionadas à ocorrência de diarreia e bacteremia (TOUCHEFEU *et al.*, 2014). De fato, o pré-tratamento

de ratos com probióticos preveniu o desenvolvimento de diarreia severa após a indução da mucosite intestinal por irinotecano. Este fato esteve relacionado ao aumento da proliferação das criptas e inibição da apoptose nos ratos que receberam o probiótico (BOWEN *et al.*, 2007). O pós-tratamento com *Saccharomyces cerevisiae* de camundongos com mucosite por irinotecano protegeu os animais do dano causado pela quimioterapia, reduzindo a perda de peso, o estresse oxidativo e estimulando a proliferação de células epiteliais intestinais (BASTOS *et al.*, 2016).

A figura 8 resume os aspectos mais importantes da patogênese da mucosite por irinotecano demonstrados até o momento. Acredita-se que o primeiro insulto para a iniciação da mucosite seja devido ao efeito citotóxico direto do irinotecano e, principalmente, de seu metabólito ativo SN-38, que causa apoptose de células epiteliais da cripta, mais do que necrose, e hipoplasia da cripta. A apoptose pode ser decorrente da ativação de proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas, BAX e BAK, observada principalmente no intestino delgado. Como consequência, ocorre o aumento da permeabilidade entre as junções comunicantes celulares e susceptibilidade aumentada à translocação bacteriana para lâmina própria intestinal (BOWEN *et al.*, 2006 apud RIBEIRO *et al.*, 2016). A injúria celular libera padrões moleculares associados ao dano (DAMPS) que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores semelhantes a Toll (TLRs) presentes nas células da resposta imune inata e em células epiteliais (NEWTON; DIXIT, 2012; WONG *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016). O reconhecimento de DAMPS e de PAMPS (padrões moleculares associados a patógenos) ativa as células residentes, o que culmina com a síntese de citocinas pró-inflamatórias (LEE *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016), amplificando o influxo de neutrófilos e dano tecidual (WONG *ET AL.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Apesar do notório papel de células do sistema imune inato, como neutrófilos, citocinas pró-inflamatórias, PAMS, DAMPS e TLRs na patogênese da mucosite por irinotecano não se sabe se há o envolvimento de células do sistema imune adaptativo neste modelo. Entretanto, a ativação de células apresentadoras de antígeno via receptores Toll e citocinas é o link entre a resposta imune inata e adaptativa, podendo ativar células T *helper naive* (Th0) a se diferenciarem nas diferentes subpopulações de células T: Th1, Th2, Th17 e T regulatórias (Tregs) (NEWTON; DIXIT, 2012).

Figura 8- Patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Fonte: Ribeiro *et al.* (2016).

Irinotecano e SN-38 induzem morte celular por apoptose através da geração de espécies reativas de oxigênio, que ativam inflamassoma e IL-1, IL-18 e IL-33 por meio da caspase-1. Essas citocinas induzem células residentes a expressar COX-2 e iNOS, o que culmina com a produção de prostaglandinas e óxido nítrico, resultando em dano intestinal. Em consequência, DAMPs e PAMPs estimulam TLR a ativarem NF-κB o que aumenta ainda mais a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas contribuem para a produção de quimiocinas e para o recrutamento de neutrófilos, amplificando a geração de espécies reativas de oxigênio e o dano intestinal.

#### 1.4 O sistema imune da mucosa gastrointestinal

A superfície mucosa constitui uma grande interface entre o hospedeiro e o ambiente. O tecido linfóide associado à mucosa é independente ao sistema imune sistêmico e deve ser capaz de discriminar micro-organismos patogênicos de antígenos alimentares e da microbiota, desenvolvendo uma resposta imune eficaz contra eles (BARRY *et al.*, 2008).

A maioria dos processos imunológicos do intestino ocorre na mucosa, a qual é compreendida pelo epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa. A primeira barreira

protetora da mucosa intestinal é a epitelial, que compõe o sistema imune inato. A camada de muco e peptídeos antimicrobianos atuam como primeira linha de defesa, mantendo os micro-organismos no lúmen intestinal. Além disso, o epitélio adjacente a folículos linfóides contém as células M (*microfold cells*), especializadas em captar e transportar antígenos luminiais para lâmina própria ou folículo linfoide associado (BROWN *et al.*, 2013; MABBOT *et al.*, 2013; MOWAT; AGACE, 2014).

Os tecidos linfóides associados à mucosa intestinal e os linfonodos de drenagem, como os mesentéricos, são os principais locais de indução da resposta imune adaptativa. Paralelamente, a lâmina própria intestinal e o epitélio representam os sítios efetores desta resposta. As estruturas linfóides organizadas melhor caracterizadas no intestino são as placas de Peyer (BROWN *et al.*, 2013; MABBOT *et al.*, 2013; MOWAT; AGACE, 2014). Seu tamanho e densidade aumentam ao longo do intestino, estando bastante concentradas no íleo distal. As placas de Peyer são ricas em linfócitos B, com áreas menores de células T, mas, diferentemente dos linfonodos, não são encapsuladas e sempre contém centros germinativos que são fontes importantes de plasmócitos produtores de IgA (MOWAT; AGACE, 2014 apud CORNES *et al.*, 1965).

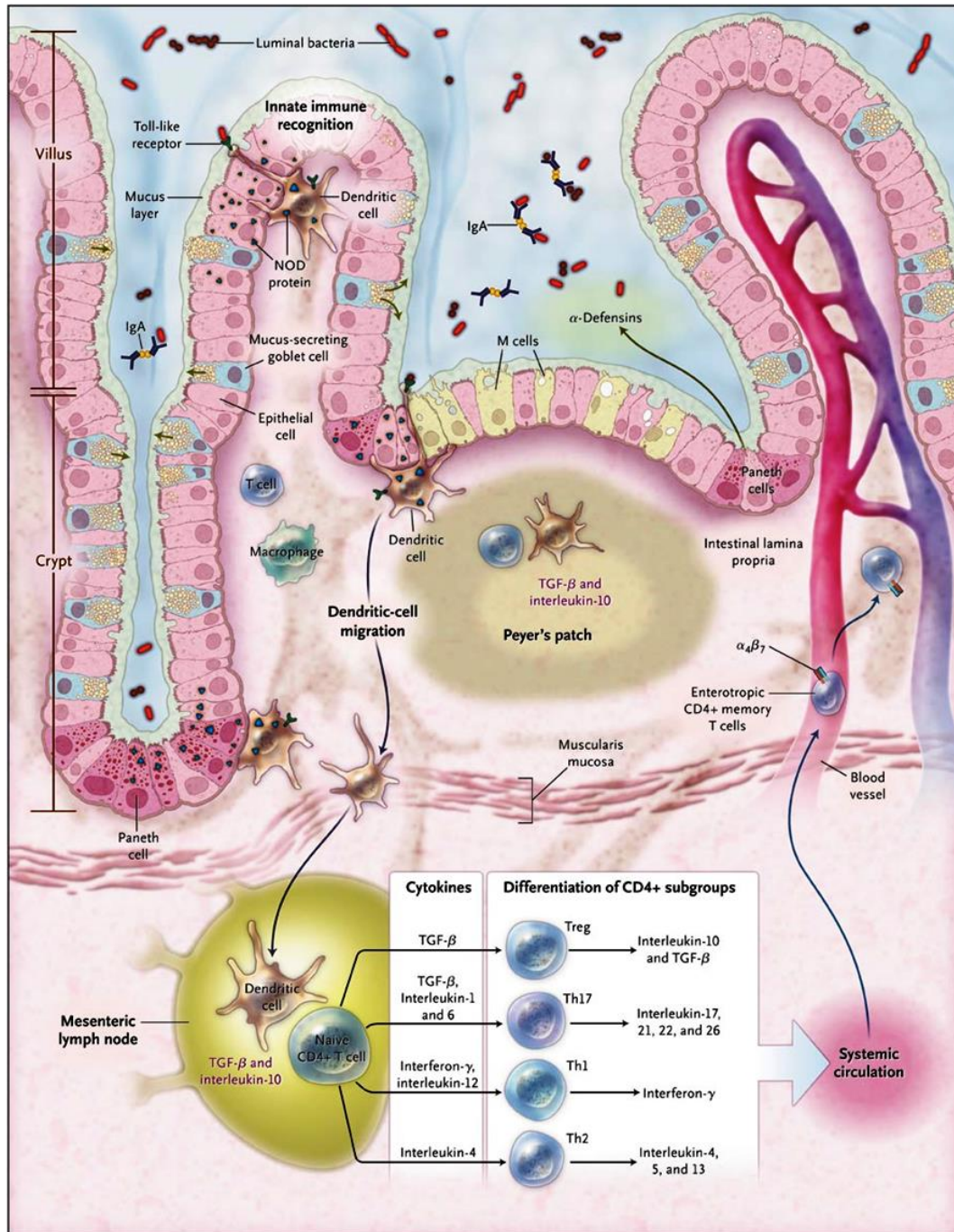
A lâmina própria é composta de tecido conjuntivo que forma a base de sustentação do vilão, contém suprimento de sangue, linfonodos de drenagem e nervos. Além disso, um grande número e variedade de células do sistema imune inato e adaptativo são encontrados nesta região, tais como: células linfóides inatas (ILC), linfócitos B e T, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos (BROWN *et al.*, 2013; MABBOT *et al.*, 2013; MOWAT; AGACE, 2014). A estrutura do sistema imune da mucosa intestinal está resumida na figura 9.

As ILC são críticas na manutenção da homeostasia intestinal, estando entre a primeira linha de defesa da superfície mucosa. Elas respondem rapidamente ao sinal de citocinas liberadas por células epiteliais, bem como à invasão de micro-organismos, com a expressão de citocinas que lembram as diferentes subpopulações de células Th1, Th2, Th17, Treg e Th22. Desenvolvem-se a partir de um precursor linfoide comum, entretanto, sua diferenciação é independente de recombinação somática, não expressam receptor de célula T e nem marcadores de linfócitos T ou B, como CD3 e CD19, respectivamente (SPITS; CUPEDO, 2012).

Três subpopulações de ILC foram descritas até o momento: ILC1, ILC2 e ILC3. Estas são equivalentes inatos das células T adaptativas Th1, Th2 e Th17/Th22, respectivamente. As células ILC3 são as mais abundantes na lâmina própria da mucosa intestinal, expressam o marcador de células Th17 ROR- $\gamma$ t e respondem à estimulação com IL-23 e IL-1 $\beta$ , produzindo IL17A, IL17F e IL22 (SPITS; CUPEDO, 2012). A IL-22 atua em células epiteliais e via sinalização STAT3 induz cicatrização e proliferação de células epiteliais. Outra citocina derivada das ILC3, IL17, está envolvida na liberação de quimiocinas por células epiteliais, com aumento da resposta inflamatória local por meio do recrutamento de neutrófilos na presença de IL-23. Contrariamente, a produção de IL-17 na ausência de IL-23 é protetora para o epitélio da mucosa intestinal (BROWN *et al.*, 2013; MABBOT *et al.*, 2013; MOWAT; AGACE, 2014).

Além das ILCs, linfócitos T CD4 e TCD8 são encontrados na lâmina própria, em uma taxa de 2:1, e a maioria possui fenótipo de memória efetora. Diversas subpopulações de células T *helper* são encontradas neste sítio da mucosa intestinal, como as células Th1, Th2, Th17 e Tregs. A distribuição e função dessas células variam consideravelmente ao longo do intestino, havendo uma correlação inversa entre o número de células Treg e Th17 em camundongos. A frequência de Treg aumenta progressivamente do duodeno ao cólon, enquanto que o número de células Th17 é maior no duodeno. Não há diferenças no número de células Th1 e Th2 ao longo do intestino (IVANOV *et al.*, 2006; MAYNARD *et al.*, 2007; VEENBERGEN; SAMSOM, 2012; SATHALIYAWALA *et al.*, 2013; MOWAT; AGACE, 2014).

Figura 9- Sistema imune intestinal.



Fonte: Abraham; Cho *et al.* (2009).

Em indivíduos saudáveis, as células caliciformes secretam uma camada de muco que limita a exposição de células epiteliais intestinais às bactérias. A secreção de peptídeos antimicrobianos por células de Paneth e a produção de IgA provê uma proteção adicional contra microbiota. O reconhecimento inato por células epiteliais, células dendríticas e macrófagos é mediado através de receptores de reconhecimento de padrão, como os receptores semelhantes a Toll (TLRs) e proteínas NOD (domínio de oligomerização de nucleotídeos). Células dendríticas (CD) apresentam antígenos a linfócitos T CD4 *naive* em órgãos linfoides

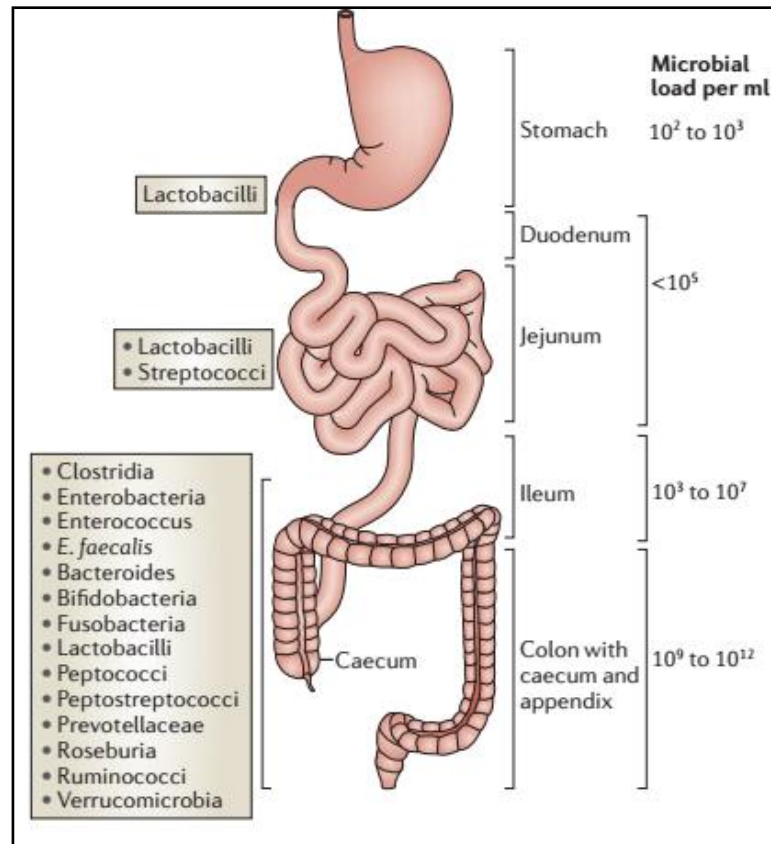


secundários, como placas de Peyer e linfonodos mesentéricos. Neste microambiente o fenótipo das CD e as citocinas presentes localmente estimulam a diferenciação das células Th0 para os diferentes fenótipos: Th1, Th2, Th17 e Tregs. Moléculas enterotrópicas, como a integrina  $\alpha 4\beta 7$ , são induzidas e promovem a migração dos linfócitos da circulação sistêmica para a mucosa intestinal. As células TCD4 ativadas nos órgãos linfoides periféricos retornam à Lâmina própria para desempenhar suas funções efetoras.

Essas diferenças na frequência das subpopulações de células T estão em parte relacionadas às diferenças na composição da microbiota nas diferentes porções do intestino. A figura 10 ilustra bem esses aspectos, mostrando a maior densidade bacteriana no íleo terminal e intestino grosso. Além de diferenças na microbiota, os intestinos delgado e grosso diferem com relação à camada de muco. No intestino delgado esta é descontínua e única, o que condiz com o requerimento da capacidade absorptiva dos enterócitos nesta região. Contrariamente, no intestino grosso, existe uma camada dupla e contínua de muco, vital para separar o epitélio da microbiota, rica neste local (OHANSSON *et al.*, 2008; WLODARSKA *et al.*, 2011; BROWN *et al.*, 2013). A camada mais interna é densa e livre de bactérias, enquanto que a camada mais externa é fina, onde residem as bactérias da microbiota (JOHANSSON *et al.*, 2011; BROWN *et al.*, 2013). A região possui uma maior quantidade de células caliciformes, produtoras de muco, do que o intestino delgado (BROWN *et al.*, 2013). Como mecanismo compensatório à estreita e descontínua camada única de muco do intestino delgado as células de Paneth, muito presentes nessa região, liberam peptídeos antimicrobianos, como defensinas e lectinas tipo C, que ficam presos à camada de muco. Estas células são essenciais para conter a invasão da microbiota através da barreira epitelial (BEVINS *et al.*, 2011; BROWN *et al.*, 2013).

Existem várias diferenças na estrutura e composição celular da mucosa dos intestinos delgado e grosso. Algumas, como a disposição das bactérias da microbiota e da camada de muco que recobre o epitélio, já foram citadas anteriormente nesta seção. Outras diferenças estão ilustradas na figura 11.

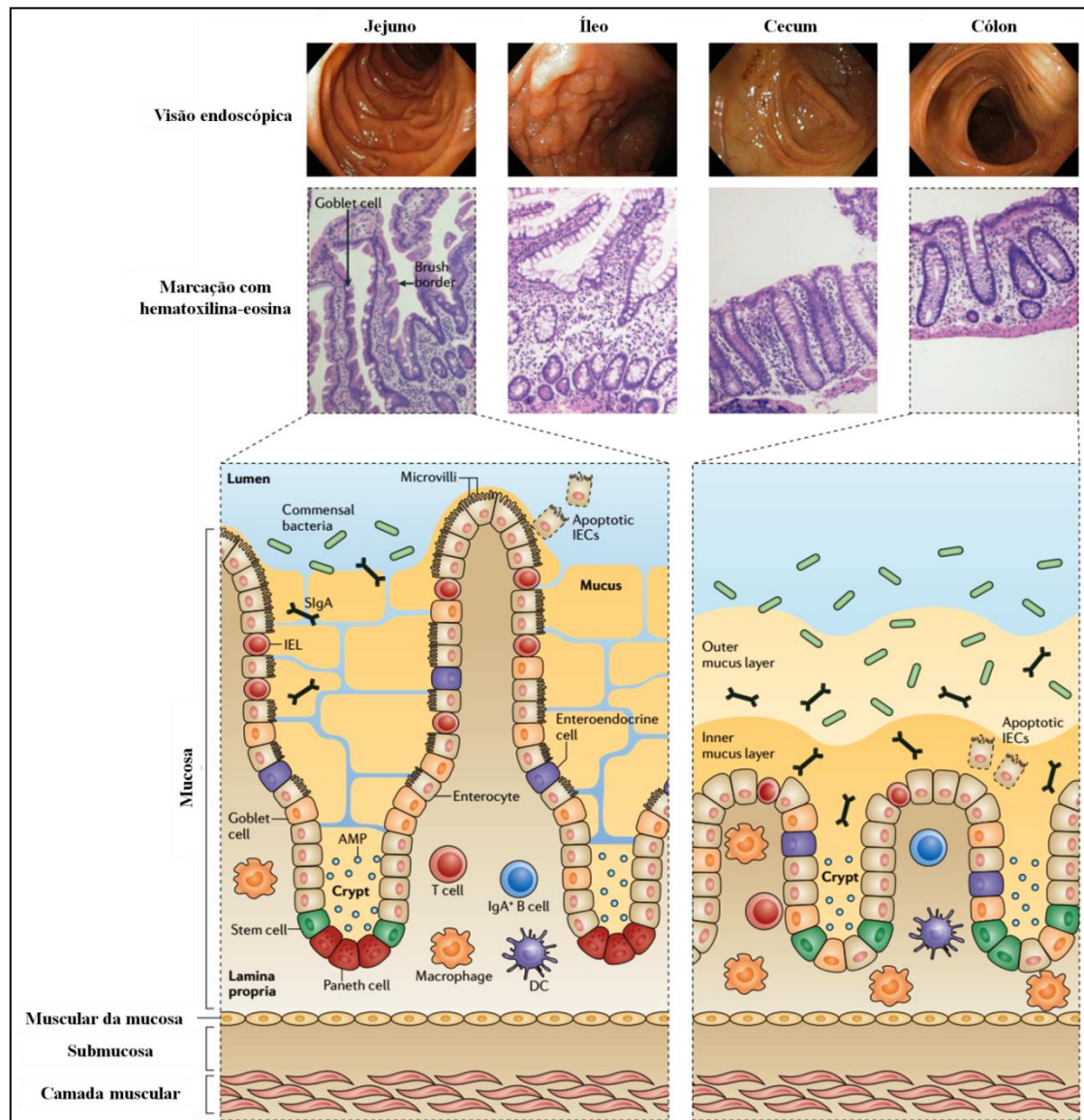
Figura 10- Distribuição espacial e composição da microbiota ao longo do trato gastrointestinal.



Fonte: Mowat; Agace (2014).

O intestino é a maior fonte de micro-organismos comensais, com mais de 500 espécies diferentes. O número de bactérias geralmente aumenta ao longo do trato gastrointestinal na direção do cécum. O íleo terminal chega a conter uma quantidade grande de bactérias, assim como o cólon.

Figura 11- Estrutura dos intestinos delgado e grosso.



Fonte: Mowet; Agace (2014).

Os diferentes segmentos intestinais possuem aparência bem distinta quando observado a partir do lúmen por meio de endoscopia (painel do topo). O intestino delgado, exemplificado pelo jejuno (painel do meio e inferior) é composto por uma extensa área contendo vilos proeminentes e com epitélio de superfície contendo microvilos que possuem enzimas digestivas, o que constitui a borda em escova. As células de Paneth, caracterizadas pela produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs), e as células caliciformes, encontram-se em maior quantidade no intestino delgado, especialmente no íleo. Abaixo da camada epitelial tem-se a lâmina própria, onde é encontrada a maioria das células do sistema imune. Entre as células epiteliais encontram-se os linfócitos intraepiteliais (IELs), em maior quantidade no duodeno do que no íleo. O vilos se torna progressivamente mais curto à medida que progride em direção ao íleo. O cécum compreende a região inicial do intestino grosso e atua como um grande reservatório para bactérias comensais. O cécum e o cólon não possuem vilos e são constituídos basicamente por criptas. As células caliciformes são numerosas nestas

regiões, enquanto que as células de Paneth são raras. Com relação à camada de muco, esta se apresenta única e descontínua no intestino delgado, enquanto que o intestino grosso dispõe de uma camada dupla e densa.

### 1.5 Subpopulações de células T regulatórias e Th17

Padrões diferentes de resposta imune adaptativa são orquestrados por subpopulações distintas de célula T. Inicialmente, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> *helper* (Th) foram divididos em duas subpopulações, Th1 e Th2, com base no perfil de citocinas produzidas em murinos (MOSMANN *et al.*, 1986) e, posteriormente, em humanos (LIEW, 2002 *apud* WIERENGA *et al.*, 1990). As células Th1 foram funcionalmente caracterizadas pela produção de IL-12 e IFN- $\gamma$ , e identificadas como ferramentas importantes no combate a infecções por micro-organismos intracelulares (LIEW, 2002). Em contrapartida, células Th2 foram descritas como auxiliares na ativação de linfócitos B e produção de anticorpos, produzindo citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13.

Durante muito tempo a dicotomia Th1/Th2 foi utilizada para explicar resistência ou susceptibilidade a muitas patologias. Entretanto, outros tipos de célula T podem interferir no balanço entre essas duas respostas e desempenhar um papel importante no controle ou indução da inflamação, como as células T regulatórias (Tregs) e Th17. As células T regulatórias (Tregs) foram inicialmente descritas em camundongos por Sakaguchi *et al.*, em 1995. Neste estudo os autores demonstraram que a inoculação, em camundongos BALB/C atímicos, de uma suspensão de células T CD4<sup>+</sup> depletadas de CD25<sup>+</sup> (receptor de IL-2) induziu o desenvolvimento de várias manifestações auto-imunes, sugerindo o papel das células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> na manutenção da homeostasia.

Estudos posteriores sugeriram o gene *Foxp3* como o principal regulador das Tregs, sendo responsável pelo seu desenvolvimento e função em murinos (FONTENOT *et al.*, 2003) e em humanos (WALKER *et al.*, 2003). As Tregs estão envolvidas na homeostasia do sistema imunológico e no controle da inflamação ao suprimirem células do sistema imune inato e adaptativo por mecanismos diversos, tais como: 1) ação via citocinas inibitórias - IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 solúveis; 2) inibição da célula T via TGF- $\beta$  de membrana; 3) apoptose da célula alvo por liberação de perforinas e granzimas; 4) morte da célula alvo por privação de IL-2; 5) inibição da maturação e função das células dendríticas (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). A ação supressora dessas células, importante para o controle da inflamação e da lesão tecidual, pode em contrapartida

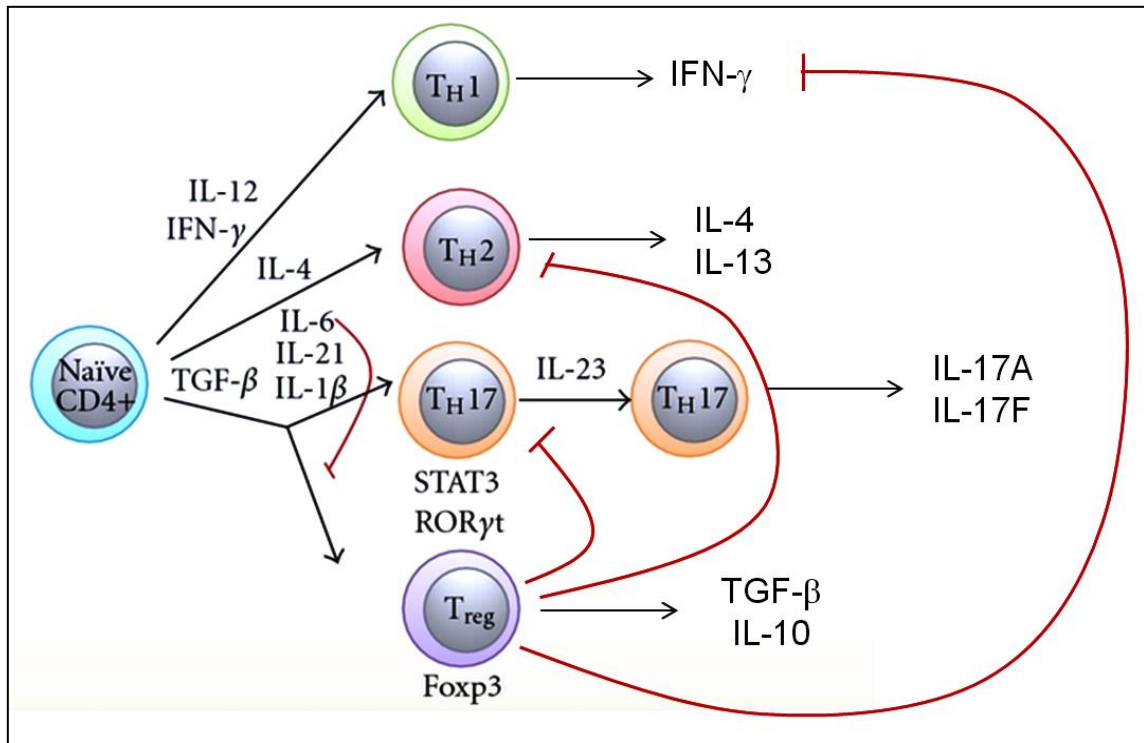
facilitar o crescimento e sobrevivência de patógenos (NETEA *et al.*, 2004; CAMPANELLI *et al.*, 2006; HOUGARDY *et al.*, 2007; EL-BADAWY *et al.*, 2012).

Assim como as células Th1 e Th2, a diferenciação dos linfócitos T *naïves* no subtipo Treg é mediada pelas citocinas produzidas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). O TGF- $\beta$  na presença de IL-2 induz a expressão de FOXP3 e a diferenciação da célula T na subclasse T regulatória (CHEN *et al.*, 2011). Interessantemente, a IL-6 inibe a indução das Tregs e na presença de TGF- $\beta$  induz a diferenciação da célula T para o subtipo Th17 (HALL *et al.*, 2011).

A subclasse Th17 foi descoberta recentemente, a partir do trabalho de Park *et al.* (2005), o qual demonstrou a existência de uma linhagem distinta de célula T CD4<sup>+</sup> produtora de IL-17. Essas células expressam o receptor nuclear ROR $\gamma$ t que é fortemente induzido na presença de TGF- $\beta$  e IL-6 (DAMSKER; HANSEN; CASPI, 2009; KORN *et al.*, 2009). Além disso, expressam os receptores de quimiocinas CCR6 e CCR4 (MORIGUCHI *et al.*, 2013). A IL-17 possui efeito sobre muitos tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais, queratinócitos e macrófagos; induzindo a produção de IL-6, IL-1, G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos) e TNF- $\alpha$ . Além disso, induz a síntese de citocinas quimioatraentes de neutrófilos e a produção de metaloproteinases de matriz, que degradam o tecido durante a resposta inflamatória (DAMSKER; HANSEN; CASPI, 2009). A importância dessas células tem sido sugerida principalmente no controle de infecções por micro-organismos extracelulares. Todavia, assim como células Th1, elas parecem estar envolvidas na patogênese de doenças autoimunes devido à sua intensa atividade pró-inflamatória (KORN *et al.*, 2009).

A figura 12 ilustra as principais subpopulações de células T, as citocinas características de cada perfil de resposta e a regulação entre elas, com as Tregs mostrando-se inibitória sobre a função das demais células.

Figura 12- Subpopulações de células T.



Fonte: Adaptado de Brandtzaeg (2010).

### 1.5.1 O eixo Treg/Th17 nas doenças inflamatórias intestinais

As células Th17 e Treg são encontradas em abundância nas superfícies mucosas, especialmente na lâmina própria intestinal, onde protegem o hospedeiro de microorganismos patogênicos ou controlam o dano causado pela resposta inflamatória excessiva, respectivamente (OMENETTI; PIZARRO, 2015).

A resposta mediada por células Th17 contribui para patogênese de várias doenças inflamatórias do trato gastrointestinal (ZENEWICZ *et al.*, 2009; SYMONS; BUDELSKY; TOWNE, 2012; RAZA; SHATA, 2012; GEREMIA *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2016; FRANCHI *et al.*, 2017). Pacientes com doença inflamatória intestinal (IBD) apresentam intenso infiltrado de células Th17 e de IL17 na mucosa intestinal (ZENEWICZ *et al.*, 2009). A citocina IL-17, produzida por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com colite ulcerativa, correlacionou-se positivamente com a gravidade da doença (RAZA; SHATA, 2012). A transferência de células T CD4<sup>+</sup>naive que perdem o receptor para IL-23 a camundongos receptores falha em induzir colite, em um modelo de colite induzido pela transferência de células T. Estes animais apresentam uma redução no

percentual de células produtoras de Th17 e a redução concomitante de células produtoras de IFN- $\gamma$ . (AHEM *et al.*, 2010).

Embora as células Th17 sejam consideradas patogênicas em vários modelos de doenças inflamatórias intestinais, em murinos e humanos, uma subclasse não patogênica dessas células foi descrita como tendo uma função protetora sobre a barreira intestinal (BETTELLI *et al.*, 2008; TORCHINSKY *et al.*, 2010). A diferenciação de células Th17 na presença de TGF- $\beta$ 1 e IL-6 resulta em células que produzem simultaneamente IL-10 e IL-17. Estas, não estão envolvidas na inflamação autoimune e podem inclusive terem ação anti-inflamatória. A diferenciação de células Th17 na ausência de TGF- $\beta$  e na presença de IL-23, IL-6 e IL-1- $\beta$  resulta em células com alta capacidade pró-inflamatória (FUSS, 2011; JAIN *et al.*, 2016). Em modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS), camundongos deficientes em IL-23 apresentam doença mais exacerbada, apesar do decréscimo nos níveis de IL-17. Paralelamente a isto, ocorre o aumento na produção de IFN- $\gamma$  por células Th1. Os autores acreditam que as células Th17 podem modular células Th1 por meio de seus receptores de superfície para IL-17 e que a IL-17 pode desempenhar uma regulação negativa sobre estas células (BECKER *et al.*, 2006). Em humanos, um recente estudo clínico com anticorpo monoclonal anti-IL-17, secukinumab, não apresentou efeito terapêutico em pacientes com doença de Crohn, além disso, alguns pacientes tiveram a doença aguda exacerbada (HUEBER *et al.*, 2011). Esses achados demonstram o quão complexo é o papel das células Th17 nos diferentes modelos de inflamação intestinal.

Em contrapartida, o papel das células Tregs na inflamação intestinal é notoriamente protetor em diversos modelos. Humanos que apresentam mutações no gene *foxp3*, necessário para diferenciação das Tregs e função, apresentam inflamação intestinal grave (BACCHETTA *et al.*, 2006; McMURCHY *et al.*, 2009). Camundongos que apresentam o comprometimento na função das Tregs desenvolvem colite espontaneamente (REISSIG *et al.*, 2016). Pacientes adultos e pediátricos com doença inflamatória intestinal apresentam elevada frequência de Tregs em tecidos inflamados e não inflamados, sugerindo a perda de função das Tregs nesses pacientes ou o desbalanço entre o número de Tregs e de outras células Th (HOLMEN *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2007; REIKVAM *et al.*, 2011; EGBERT; HERK, 2016).

Contrariamente, Maul *et al.*, 2005, e Wang *et al.*, 2011, demonstraram uma redução na frequência de células Tregs no sangue periférico de pacientes com IBD quando

comparados com controles saudáveis. Ao nível de mucosa intestinal os mesmos autores encontraram resultados diferentes do observado sistemicamente, com aumento na frequência de Tregs. A transferência adotiva de células Tregs a murinos melhora os sintomas da colite induzida por DSS (Dextran Sulfato de Sódio), com redução do infiltrado leucocitário e da depleção de células caliciformes (HSU *et al.*, 2013).

Apesar da importância do eixo Th17/Treg no desenvolvimento ou controle do processo inflamatório intestinal não foi demonstrado na literatura o papel dessas células na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano. Entretanto, há indícios de que a quimioterapia antineoplásica modula o padrão de resposta imune do indivíduo, como sugerido por Xynos *et al.* (2013). Neste estudo, os autores investigaram a influência do tratamento com irinotecano/5-fluoracil/leucovorina, sozinho ou em combinação com cetuximabe, na frequência de Tregs e na produção de citocinas no sangue periférico de pacientes com câncer colorretal metastático. Após o tratamento, observou-se um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18, esta com participação comprovada na mucosite induzida pelo irinotecano, e um decréscimo nos níveis de IL-4, IL-10 e Tregs.

### **1.6 A ciclofosfamida como ferramenta farmacológica para depleção de Tregs**

A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada alquilante de DNA. Possui efeito citotóxico ao se intercalar na molécula de DNA, sendo ciclo-celular não-específico. Em altas doses (>200mg/kg) é utilizada no tratamento de neoplasias e doenças autoimunes. Entretanto, em doses menores a esta, a ciclofosfamida é capaz de aumentar a resposta imunológica, sem exercer ação citotóxica sobre outras células (BRODE; COOKE, 2008). Atualmente, sabe-se que o seu efeito imunoestimulatório em baixas doses é decorrente da ação citotóxica seletiva sobre as células T regulatórias, como evidenciado em estudos com murinos (ZHAO *et al.*, 2010) e em humanos (DIMELOE *et al.*, 2014; HEYMANN *et al.*, 2013). Lutsiak *et al.*, 2005, demonstraram que, na dose única de 100 mg/kg, a ciclofosfamida induz a uma depleção de cerca de 50% na frequência de células Tregs nos linfonodos e baço de camundongos C57BL/6 no quarto dia após a administração, perdurando até o décimo dia. Além disso, a ciclofosfamida reduziu a capacidade supressora *in vitro* das Tregs, bem como a expressão de moléculas relacionadas à função dessas células, como FOXP3. Devido à sua seletividade citotóxica em baixas doses sobre células



Tregs, a ciclofosfamida tem sido considerada uma ferramenta farmacológica promissora na modulação específica dessas células, sem efeito sobre as outras células do organismo.

## 2 JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal é um efeito colateral comum da quimioterapia antineoplásica à base de irinotecano. Infelizmente, alguns pacientes são irresponsivos à terapia com loperamida, utilizada para controle da diarreia. Aqueles com graus mais severos da doença, 3 e 4, possuem elevado risco de sepse e elevada mortalidade. Adicionalmente, a ocorrência da mucosite culmina na redução dos ciclos e/ou doses da quimioterapia, prejudicando a eficácia terapêutica dos anti-neoplásicos, além de aumentar os dias de hospitalização e os custos com a saúde como um todo. A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na ocorrência desse efeito colateral é de suma importância para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas eficazes em todos os estágios da mucosite.

Nosso grupo, vem, ao longo dos anos, investigando os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da mucosite intestinal associada a quimioterápicos, especialmente ao irinotecano. O envolvimento de diversos mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , KC, TNF- $\alpha$ , IL-18, IL-33, NO e COX-2; e de células do sistema imune inato, como neutrófilos, já foi demonstrado por nós e por outros grupos. Entretanto, o papel de outras células do sistema imune inato, bem como de células do sistema imune adaptativo, cuja ativação é promovida em parte por estas citocinas, não foi avaliado ainda.

O envolvimento de células linfóides da imunidade inata do tipo 3, Tregs, Th17, bem como de outras células Th, tem sido demonstrado em diferentes modelos de doenças inflamatórias intestinais, em murinos e em humanos. Entretanto, não se sabia até o momento se essas células estariam alteradas em frequência na mucosite intestinal por irinotecano e nem qual a relação delas com a fisiopatologia desse efeito colateral.

### **3 PERGUNTAS DE PARTIDA E HIPÓTESES**

Diante do exposto, nós formulamos os seguintes questionamos: Ocorre alteração na frequência de células Tregs, Th17, Th não-reg e não-Th17 e/ou ILC3 na mucosa intestinal e/ou a nível sistêmico nos camundongos com mucosite induzida por irinotecano? Qual o impacto da depleção das Tregs no desenvolvimento e gravidade da mucosite intestinal nos animais, bem como na frequência de células Th17, Th7-não reg e não Th17, neutrófilos e ILC3 intestinais?

Acreditamos que a frequência das células Tregs encontre-se reduzida no intestino dos animais com mucosite quando comparados aqueles do grupo controle. Adicionalmente, que o número de células Th17 e ILC3 esteja elevado no intestino desses animais. A depleção de células Tregs com ciclofosfamida deverá agravar a mucosite intestinal, aumentando ainda mais a frequência de células Th17 e neutrófilos nesse modelo. Hipotetizamos que as alterações intestinais serão observadas também a nível sistêmico.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Geral**

✓ Traçar o perfil de expressão das células Tregs, Th7, Th (não-reg e não-Th17) e linfoides inatas do tipo 3 ao longo do desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano nos animais e avaliar o papel das Tregs na patogênese.

### **4.2 Específicos**

✓ Determinar a frequência das células Tregs, Th17 e Th não-reg e não-Th17 na lâmina própria intestinal e baço de camundongos com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

✓ Determinar a frequência e fenótipo de células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3) na lâmina própria intestinal dos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

✓ Identificar os níveis das citocinas IL-10, KC e IL-1 e a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-17A no intestino dos animais.

✓ Modular farmacologicamente as subpopulações de células Tregs e avaliar o impacto disto no desenvolvimento, gravidade e parâmetros inflamatórios da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

✓ Correlacionar a frequência das diferentes subpopulações celulares entre si e com parâmetros de gravidade da mucosite.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

“A terapia perfeita não foi desenvolvida. [...] Precisamos fazer o melhor uso possível do que temos agora” (Bruce Chabner).

### 5.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com peso entre 18 e 25g, provenientes do biotério setorial do departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Esta linhagem foi selecionada devido à adequada reprodutibilidade do modelo experimental nestes animais. Além disto, muitos dados prévios da fisiopatologia da mucosite por irinotecano foram obtidos com esta linhagem (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014, WONG *et al.*, 2015). Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, com 31 cm de largura e 17 cm de altura forradas com maravalha. Esta foi trocada duas vezes por semana. As caixas foram acondicionadas em ambiente adequado com exaustão de ar e temperatura controlada,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Foi respeitado o ciclo claro/escuro de 12h cada e os animais tiveram livre acesso a água e ração.

### 5.2 Aspectos éticos

Este trabalho adere aos princípios presentes no guia para cuidados e uso de animais de laboratório (McGRATH *et al.*, 2010). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. Durante os experimentos, alguns animais sucumbiram à morte em decorrência do tratamento e suas consequências, como a diarreia. Aqueles animais que apresentaram sinais de morte iminente, tais como piloereção, locomoção reduzida, incapacidade para se manterem na posição em pé, ataxia, tremor e alteração na frequência respiratória, foram eutanasiados com uma dose elevada de quetamina e xilazina overdose ( $> 100/10 \text{ mg kg}^{-1}$ , s.c., União Química, São Paulo, Brazil), seguido de deslocamento cervical. Analgésicos ou anestésicos não foram utilizados em nossos experimentos, uma vez que estes agentes interferem diretamente na produção de mediadores inflamatórios e/ou alteram o trânsito gastrointestinal, podendo mascarar os eventos de diarreia nesse modelo animal. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 75/2013 (ANEXO A).

### 5.3 Drogas

Foram utilizados os seguintes fármacos: Cloridrato de Irinotecano (Evoterin, Evolabis, São Paulo, Brazil, 100 mg por ampola); Ciclofosfamida (Genuxal, Baxter, Halle/Westfalen, Alemanha, 200 mg por ampola) e salina 0,9% estéril.

### 5.4 Indução da mucosite intestinal experimental

A mucosite foi induzida de acordo com protocolo desenvolvido por Ikuno *et al.* (1995) e adaptado para as condições experimentais do laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer. Os animais receberam uma dose única diária de 75mg/kg de irinotecano, por via intraperitoneal, durante quatro dias consecutivos. A eutanásia foi realizada em dias ímpares, dia 1 (D1), D3, D5 e D7, para avaliação cinética dos parâmetros relacionados à mucosite, tais como: diarreia, infiltração de neutrófilos no intestino, frequência de células Tregs e Th17 na lâmina própria e no baço e achados histopatológicos e morfométricos. Após anestesia dos animais foi coletado sangue periférico do plexo retro-orbital com capilares heparinizados, seguido de eutanásia por deslocamento cervical. Foram coletadas amostras de intestino e baço para realização da imunofenotipagem das células Treg e Th17 e seguimentos de íleo para ensaio da mieloperoxidase (MPO), morfometria, histopatologia, dosagem de citocinas e realização de PCR em tempo real.

### 5.5 Depleção das células T regulatórias com ciclofosfamida

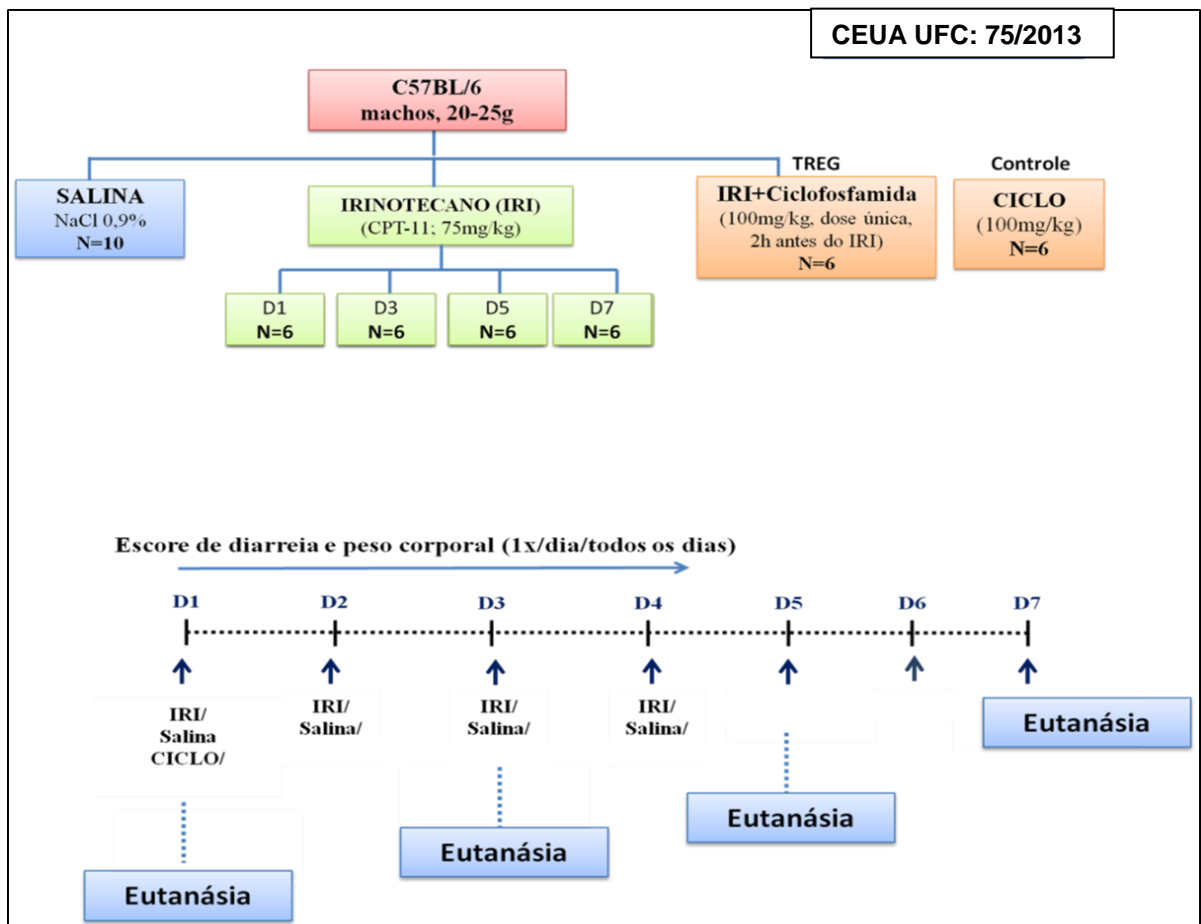
Com intuito de avaliar o papel das células Tregs na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano realizou-se a depleção destas células com uma dose baixa e única de ciclofosfamida. De acordo com Zhao *et al.*, 2010, a ciclofosfamida em doses baixas é uma droga promissora na depleção seletiva de Tregs. A utilização de 100mg/kg intraperitoneal em dose única é capaz de depletar mais de 50% de Tregs em camundongos C57BL/6 no quarto dia após a administração. Essa depleção perdura até o décimo dia, quando os níveis de Tregs começam a retornar ao normal (LUTSIK *et al.*, 2005). Seguindo este protocolo nós administramos ciclofosfamida (100 mg/kg/dia em dose única), isoladamente, no grupo controle, ou 2 horas antes da primeira dose de irinotecano, para depleção das Tregs. A eutanásia dos animais foi realizada apenas no sétimo dia experimental tendo em vista que é neste dia que observamos uma maior frequência de Tregs, como será descrito na seção dos resultados. Para a analisar o impacto que a depleção das Tregs tem

sobre a sobrevivência dos animais, estes foram acompanhados por quatorze dias, sendo o peso e a diarreia avaliados diariamente.

## 5.6 Síntese esquematizada do protocolo experimental e linha temporal

A figura 13, painel do topo, traz o esquema com os grupos experimentais utilizados, bem como o número de animais em cada grupo. Além disso, no painel inferior da mesma figura, pode-se visualizar a linha temporal experimental, com a determinação dos dias das administrações e da eutanásia.

Figura 13- Grupos experimentais e linha temporal.



## 5.7 Parâmetros de avaliação da indução da mucosite intestinal

### a) Avaliação ponderal

Os animais foram pesados uma vez ao dia durante todo o protocolo experimental. Os resultados obtidos foram expressos como percentual de variação de massa corpórea.

**b) Avaliação do grau de diarreia**

A diarreia foi avaliada por único observador de acordo com protocolo de Kurita *et al.* (2000). Este protocolo utiliza uma escala do tipo *likert* que variando de 0-3, conforme a consistência das fezes e sujidade perianal: 0- fezes com aspecto inalterado; 1- fezes levemente umedecidas; 2- Fezes úmidas com pouca sujidade perianal; 3- Fezes úmidas com bastante sujidade perianal. A diarreia foi avaliada diariamente, uma vez ao dia e antes da administração do irinotecano, durante todo o experimento.

**c) Contagem de leucócitos**

No dia da eutanásia, após anestesia dos animais coletou-se o sangue venoso periférico do plexo retro-orbital para avaliação da indução de leucopenia pelo irinotecano. Foram coletados aproximadamente 400 µl de sangue de cada animal e colocados em tubos eppendorf contendo 20 µl de heparina. 20 µl de sangue heparinizado foram adicionados a 380 µl de solução de Turk, contendo: ácido acético, para lise das hemácias, e violeta genciana, para coloração do núcleo dos leucócitos. Após homogeneização, 10 µl do sangue lisado foi adicionado à câmara de Neubauer. A média do número de leucócitos nos 4 quadrantes maiores e externos da câmara foi obtida, multiplicada pelo fator de correção da câmara,  $10^4$ , e pelo fator de diluição, 20. O resultado foi expresso em número de leucócitos por µl de sangue.

**d) Análise histopatológica e morfométrica de amostras de íleo.**

No dia da eutanásia foram removidos cinco segmentos de meio centímetro cada da porção mais distal do íleo. Um desses segmentos foi colocado em cassete e embebido em formal tamponado a 10%. 24 horas após a fixação as amostras foram retiradas do formol e colocadas em álcool etílico hidratado 70%, onde permaneceram até o processamento para coloração pelo método hematoxilina-eosina (HE).

A análise histopatológica foi realizada por patologista e o grau e a gravidade da lesão intestinal definido de acordo com os escores modificados de Macpherson e Pfeiffer, 1978, variando de 0 a 3:

✓ **Grau 0:** achados histológicos normais.



- ✓ **Grau 1:** Mucosa- encurtamento dos vilos; perda da arquitetura das criptas; infiltrado inflamatório escasso; vacuolização e edema. Camada muscular: normal.
- ✓ **Grau 2:** Mucosa- Encurtamento de vilos com células inchadas e vacuolizadas; necrose de criptas; intenso infiltrado celular; vacuolização e edema. Camada muscular: normal.
- ✓ **Grau 3:** Mucosa- Encurtamento de vilos com células inchadas e vacuolizadas; necrose de criptas; intenso infiltrado celular; vacuolização e edema. Camada muscular: edema, vacuolização e infiltrado neutrofilico.

A análise morfométrica foi realizada para a obtenção da razão vilo/cripta, uma medida indireta da capacidade absorptiva do intestino. Para tal, realizou-se a mensuração da altura do vilo, distância de sua base ao topo, e da profundidade das criptas, distância do ponto de encontro entre dois vilos até o início da camada submucosa, utilizando o software ImajeJ. Foram medidos 10 vilos e 10 criptas por corte histológico em aumento de 100x no microscópio óptico. Em seguida realizou-se a razão entre as duas medidas no Excel.

**e) Quantificação indireta de neutrófilos no íleo por meio da determinação da enzima mieloperoxidase (MPO).**

A enzima MPO encontra-se presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo utilizada como um marcador para a presença dessa célula no tecido. Para sua quantificação, foram adicionados 200 µl de tampão contendo NaCl 0,1M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M e NaEDTA 0,012M (pH 4,7) ao segmento de íleo de cerca de meio centímetro. O tecido foi homogeneizado utilizando o macerador (Pollytron) e em seguida centrifugado a 3.000rpm por 15 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante foi adicionado 1 ml de tampão contendo NaCl 0,2% para lise do sedimento celular (*pellet*) e agitado fortemente em vórtex por 30 segundos. Após nova centrifugação o *pellet* foi ressuspenso em 300 ml de tampão contendo NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) e brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5%. Após nova maceração o material foi centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C.

50 µl do sobrenadante resultante foram adicionados ao poço da placa de 96 poços, fundo chato, para realização da dosagem da MPO. Após a adição das amostras nos seus respectivos poços, adicionou-se 50 µl de neutrófilos ao primeiro ponto da curva padrão. Realizou-se a diluição seriada dos neutrófilos nos pontos seguintes da curva. Os neutrófilos utilizados para realização da curva padrão foram obtidos no LAFICA a partir do lavado da cavidade peritoneal de animais com peritonite, foram quantificados e alíquotados em

concentrações definidas para uso nos ensaios de MPO ( $1 \times 10^7$  células em 50  $\mu$ l). O branco foi realizado adicionando-se tampão  $\text{NaPO}_4$  0,08 M no lugar da amostra, com a adição de todos os demais reagentes. Após o plaqueamento das amostras e dos neutrófilos adicionou-se 25  $\mu$ l de tetrametilbenzidina 1,6 Mm (TMB), atuando como cromógeno da reação. Imediatamente após, adicionou-se 100  $\mu$ l do substrato da enzima MPO, peróxido de hidrogênio 0,5 Mm. Incubou-se a placa por 5 minutos a 37°C para catalização da reação. Ao término deste tempo a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. A placa foi imediatamente lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos por mg de tecido (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

### **5.8 Isolamento dos linfócitos da lâmina própria intestinal**

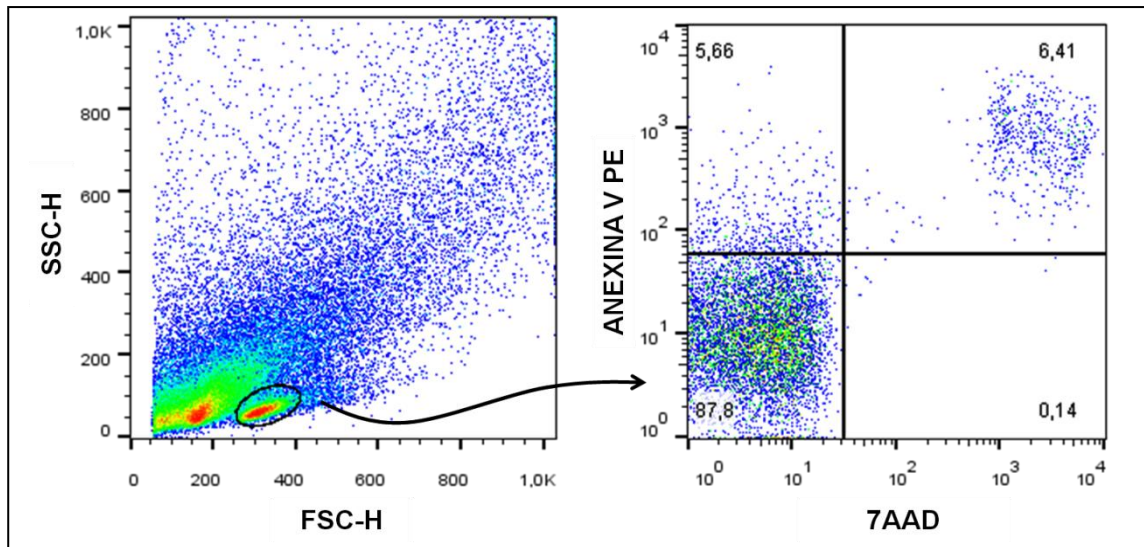
Os linfócitos da lâmina própria intestinal foram isolados de acordo com protocolo de Sheridan e Lefrançois, 2012, adaptado para nossas condições experimentais. Inicialmente, após a eutanásia dos animais, o intestino foi cortado a cerca de 5 cm abaixo do estômago, imediatamente abaixo do esfíncter pilórico e aproximadamente 1 cm acima do cecum. O intestino foi puxado cuidadosamente a partir do cecum, desta forma, a remoção do mesentério, importante para maior rendimento celular, é realizada eficazmente. Imediatamente, todo o intestino foi colocado em uma placa de petri, sobre uma barra de gelo, contendo papel filtro umedecido com tampão CMF gelado (HBSS livre de cálcio de magnésio, tampão HEPES-bicarbonato e soro fetal bovino 5%). Neste momento foi realizada a remoção minuciosa da gordura e mesentério adjacente utilizando tesoura tipo íris e pinça adequada. O tecido era humedecido periodicamente com CMF gelado para evitar o ressecamento. Posteriormente, realizou-se a remoção das placas de Payer a olho nu, utilizando tesoura tipo íris. Aproximadamente 10 placas foram retiradas do intestino delgado de cada animal e desprezadas. Após a remoção das placas o material fecal e muco foi removido utilizando pinça de ponta curva, fazendo uma gentil pressão para baixo sobre o intestino ao longo do seu comprimento para expelir material fecal e muco. Usando uma tesoura fina com uma extremidade romba em um ponto o intestino foi aberto longitudinalmente ao longo de seu comprimento, sendo feito em seguida cortes lateralmente em peças de 0,5 cm. As peças intestinais foram colocadas em tubo falcon de 50 mL e adicionado 30 ml de CMF gelado. Os tubos foram invertidos 10x para remoção de material

fecal e muco remanescente. Esse procedimento foi repetido três vezes até o sobrenadante ficar claro.

As peças intestinais foram transferidas para tubo erlenmeyer de 50 mL e adicionado 25 mL de tampão DTE (HBSS livre de  $\text{Ca}_2^+$  e  $\text{Mg}_2^+$ , tampão HEPES-bicarbonato, soro fetal bovino inativado 10%, EDTA 0,1 Mm), incubadas por 20 minutos em agitação a aproximadamente 220 rpm a 37°C. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento repetido novamente. Posteriormente 25 mL de tampão EDTA foram adicionadas ao erlenmeyer (HBSS livre de  $\text{Ca}_2^+$  e  $\text{Mg}_2^+$ , HEPES, L-glutamina, 2000 U/mL de penicilina, 2mg/mL de estreptomicina, 5µg/mL de gentamicina, soro fetal bovino inativado 10%, EDTA 1,3 mM. Incubou-se por 30 minutos 37°C em agitação. Desprezou-se o sobrenadante e o procedimento foi repetido. Para digestão enzimática do tecido incubou-se por 45 minutos com 35 mL de solução contendo colagenase (100 U/mL) em agitação a 37°C. Após incubação, a solução foi depositada sobre peneira de células de 70 µm acoplada a tubo falcon de 50 mL e o tecido remanescente macerado mecanicamente com embolo de uma seringa de 3 mL. O *pellet* resultante após centrifugação foi submetido a separação em gradiente de percoll 44% (8 mL) e 67% (5 mL). Centrifugou-se por 20 minutos, 600g, 24°C, sem freio. A nuvem linfocitária foi removida entre a interface dos dois gradientes e as ressuspensas em PBS. A viabilidade celular foi verificada em câmara de Neubauer utilizando azul de tripan. Foi dado seguimento à imunofenotipagem quando mais de 85% das células foram consideradas viáveis.

A padronização deste protocolo foi um processo cuidadoso e laborioso, tendo em vista que foi executado pela primeira vez no LAFICA. Durante essa etapa a viabilidade celular foi checada também pela marcação com ANEXINA V PE e 7-AAD, conforme as recomendações do fabricante (BD Biosciences, USA). A anexina V tem alta afinidade pela fosfatidilserina que é exposta na superfície extracelular da célula quando a mesma entra em apoptose. O 7-AAD é um corante fluorescente com a capacidade de se intercalar na molécula de DNA, é capaz de penetrar na célula apenas quando há ruptura de membrana, sendo indicador de apoptose tardia ou necrose celular (LECOUER *et al.*, 1997). Observamos que, após a padronização adequada, o método de extração dos linfócitos do intestino delgado apresentou bom rendimento celular (aproximadamente  $4 \times 10^6$  linfócitos por animal), com baixo percentual de células necróticas (ANEXINA V<sup>+</sup> e 7-AAD<sup>+</sup>= 6,41%), como podemos observar na figura 14 abaixo. Ainda nesta imagem pode-se observar que 87,8% das células são viáveis (negativas para ambos os marcadores).

Figura 14- Percentual de apoptose e necrose dos linfócitos após a extração do intestino.



Os linfócitos foram isolados da lâmina própria intestinal de camundongos C57BL/6 machos de acordo com protocolo adaptado de Sheridan e Lefrançois, 2012. Após digestão mecânica e enzimática, os linfócitos foram purificados em gradiente de percoll 44% e 67%. A interface resultante foi coletada, os linfócitos contados em azul de tripan e  $1 \times 10^6$  células totais (incluindo viáveis e não viáveis) foram submetidas a marcação com ANEXINA V PE e 7-AAD por 15 minutos. A leitura foi realizada em citometro de fluxo e o número de células apoptóticas e necróticas identificadas.

### 5.9 Isolamento dos linfócitos esplênicos

O baço dos animais foi removido após a eutanásia, umedecido com meio RPMI contendo soro fetal bovino 10%, e cortado em três segmentos. Os seguimentos foram colocados em peneira de células de 70  $\mu\text{m}$  acoplada a tubo falcon de 50 mL e macerados mecanicamente com êmbolo de uma seringa de 3mL. O *pellet* resultante foi ressuspenso em PBS e a viabilidade checada utilizando azul de tripan. As células foram utilizadas quando a viabilidade foi maior do que 85%.

### 5.10 Imunofenotipagem das subpopulações de células Treg e Th17 por citometria de fluxo

Os linfócitos isolados da lâmina própria intestinal e do baço foram submetidos à marcação com anticorpos para determinação das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo. Para tal, o painel de anticorpos foi cuidadosamente selecionado e titulado para escolha da melhor concentração capaz de detectar elevado número de células e alta intensidade de fluorescência para o marcador em questão. Para titulação todos os anticorpos

foram diluídos nas seguintes concentrações: 1:100; 1:200; 1:400; 1:800. Foram utilizadas  $1 \times 10^6$  células por tubo de citometria para titulação e no ensaio propriamente dito. As células foram incubadas por 30 minutos com as variadas concentrações dos anticorpos de superfície, a 4°C no escuro. Após o período de incubação adicionou-se 2 mL de tampão de FACS contendo PBS e soro fetal bovino 1%. Centrifugou-se a 450g por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante repetiu-se esta etapa de lavagem. Em seguida, adicionou-se 1mL da solução de trabalho Fix/Perm. As amostras foram encubadas *overnight*, 16 horas, com este tampão de fixação e permeabilização no escuro a 4°C. Sem lavar, adicionou-se 2 mL do tampão Perm e centrifugou-se por 5 minutos, 350g, 4°C. Após descarte do sobrenadante os anticorpos para marcação intracelular foram adicionados e incubados por 30 minutos, 4°C, no escuro. Após duas lavagens com 2 mL de tampão de FACS as células foram ressuspensas em 500 µl de paraformaldeído 1% e acondicionadas no escuro a 4°C. A leitura foi realizada em até 24 horas em citometro de fluxo FACSCalibur com 2 lasers (BD Biosciences, USA), sendo adquiridos até 100 mil eventos na *gate* de linfócitos. As análises foram realizadas por único avaliador utilizando o software FlowJo versão 10 (Treestar US, Ashland, OR). Os quadrantes foram definidos de acordo com os controles isotipicos.

***Anticorpos para marcação de superfície:***

- ✓ Anti-CD3 APC; anti-mouse, clo- 145-2C11 (BD Biosciences; 553066)
- ✓ Anti-CD4 PerCP; anti-mouse, clo-RM4-5 (BD Biosciences; 553052)
- ✓ Anti-CD25 FITC; anti-mouse, clo-3C7 (BD Biosciences; 558689)
- ✓ Anti- CCR6 Alexa Fluor® 647; anti-mouse , clo- 29-2L17 (Biolegend; 129808)
- ✓ Anti-CD3 FITC; anti-mouse, clo-145-2C11 (BD Biosciences; 553061)
- ✓ Rat IgG2b K FITC; Isotipo do CD25, clo-A95-1 (BD Biosciences; 553988)
- ✓ Alexa Fluor® 647 Arm. Ham. IgG (Biolegend; 400924)

***Anticorpos para marcação de intracelular:***

- ✓ Anti-FOXP3 PE; anti-mouse, clo-FJK-16s (Ebioscience; 12-5773-82)
- ✓ Anti-RORγt PE; anti-mouse, human, clo-AFKJS-9 (Ebioscience; 12-6988-82)
- ✓ Rat IgG2a K PE; Isotipo do FOXP3 e ROR-γt (Ebiosciences; 12-4321-82)

***Tampões:***

- ✓ Staining buffer (FACS): PBS, SFB 1%, azida sódica 0,1%
- ✓ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Ebiosciences; 00-5523-00)

***Painéis de marcação:***

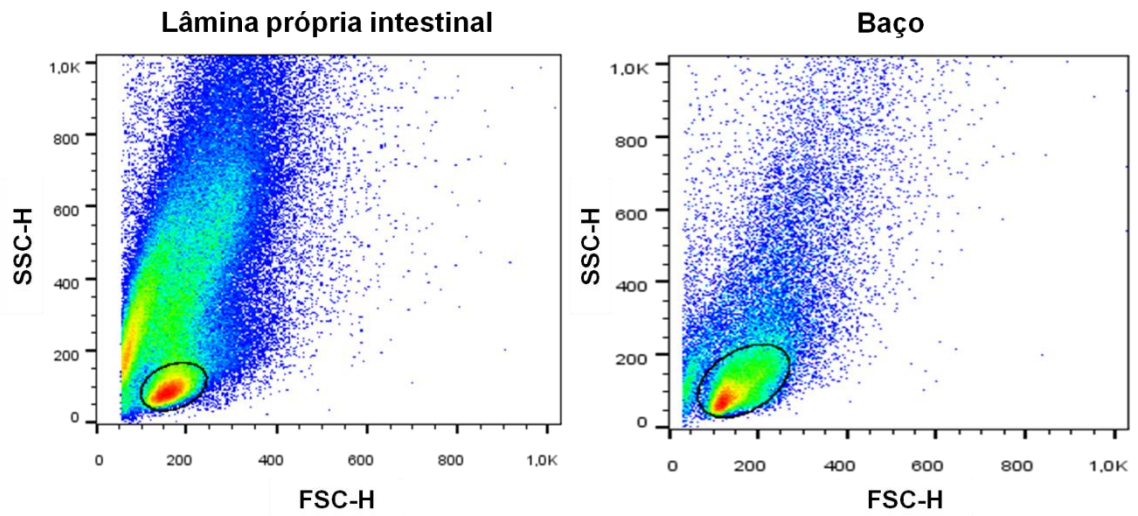
- ✓ Treg: anti CD3 APC/ CD4 PerCP/ CD25 FITC/ FOXP3 PE
- ✓ Th17: anti-CD3 FITC/ CD4 PerCP/ ROR- $\gamma$ t/ CCR6 Alexa 647
- ✓ Controles isotípicos: Rat IgG2b kpa FITC / Rat IgG2a PE /Alexa 647 Arm. Hamster IgG / Rat IgG2a PE

**5.11 Estratégia de seleção (*gate*) das subpopulações linfocitárias**

Inicialmente os linfócitos foram selecionados conforme suas características de tamanho (FSC) e granulosidade ou complexidade interna (SSC). Como podemos visualizar na figura abaixo (figura 15), os linfócitos são células com pequeno tamanho e granulosidade. Nas células que sofreram fixação e permeabilização este tamanho torna-se ainda mais reduzido.

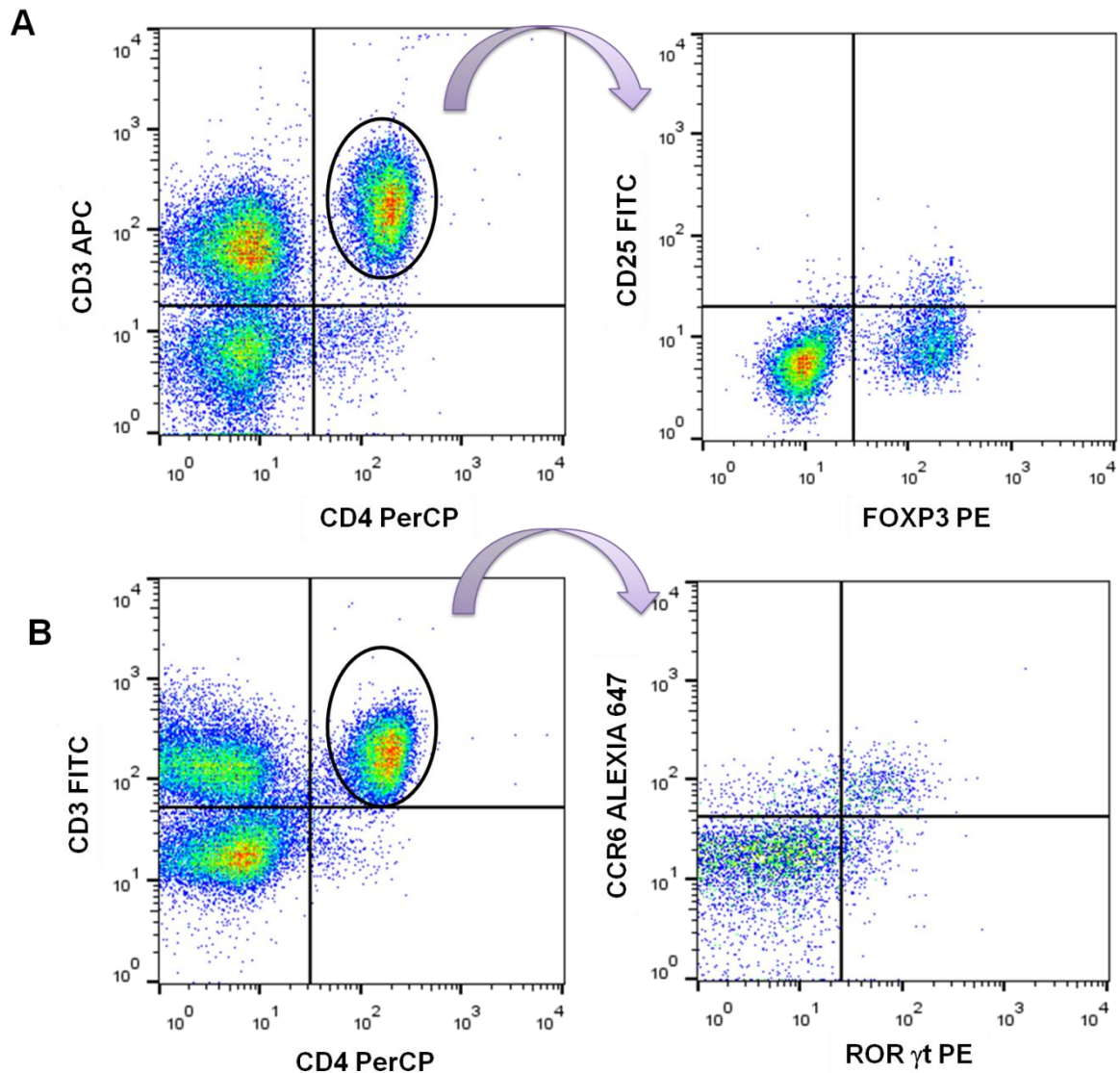
Após a seleção da população de linfócitos, dois dot plots adicionais foram realizados para identificação de cada uma das subpopulações de células Tregs e Th17. A figura 16 ilustra a estratégia de seleção dos marcadores de cada tipo celular. Ao final da análise um % de células é gerado sendo considerado como Treg as células  $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$  e como Th17 as  $CD3^+CD4^+ROR-\gamma t^+CCR6^+$ .

Figura 15- Características de tamanho e granulidade dos linfócitos intestinais e esplênicos.



Os linfócitos foram isolados da lâmina própria intestinal de camundongos C57BL/6 machos de acordo com protocolo adaptado de Sheridan e Lefrançois, 2012. Após digestão mecânica e enzimática, os linfócitos foram purificados em gradiente de percoll 44% e 67%. A interface resultante foi coletada, os linfócitos contados em azul de tripan e  $1 \times 10^6$  células totais foram submetidas a imunofenotipagem para marcação de células Tregs e Th17. A leitura foi realizada em citometro de fluxo.

Figura 16-Estratégia de seleção das células Treg e Th17.



Os linfócitos foram isolados da lâmina própria intestinal de camundongos *C57BL/6* machos de acordo com protocolo adaptado de Sheridan e Lefrançois, 2012. Após digestão mecânica e enzimática, os linfócitos foram purificados em gradiente de percoll 44% e 67%. A interface resultante foi coletada, os linfócitos contados em azul de tripan e  $1 \times 10^6$  células totais foram submetidas a imunofenotipagem para marcação de células Tregs e Th17. Após a gate na população de linfócitos as células Tregs foram identificadas conforme o painel A e as células Th17 conforme o painel B. A imagem ilustra amostras de intestino delgado, entretanto as mesmas análises foram realizadas nas células do baço.

### 5.12 Ensaio imunoenzimático para quantificação de citocinas (ELISA)

Para realização do ELISA, um fragmento de íleo de 0,5 cm foi utilizado. O tecido foi ressuspenso em  $250 \mu\text{l}$  de PBS com inibidor de protease e homogeneizado em macerador. Após centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ ,  $100 \mu\text{l}$  de sobrenadante



foi adicionado ao poço da placa de 96 poços fundo chato, previamente sensibilizada *overnight* (16h) a 4°C com 100 µl do anticorpo de captura e bloqueada com 300 µl de PBS-BSA 1%. Uma concentração conhecida da citocina padrão foi adicionada ao primeiro ponto da curva, seguido de diluição seriada, conforme as recomendações do fabricante (R&D Systems). Ao poço correspondente ao branco foi adicionado apenas o diluente. Após duas horas de incubação à temperatura ambiente (24°C) a placa foi lavada três vezes com 400 µl de tampão contendo PBS filtrado e tween-20 0,05%. Adicionou-se 100 µl do anticorpo de detecção biotinizado diluído em PBS-BSA 1% na concentração de trabalho indicada pelo fabricante para cada citocina em questão. Incubou-se por duas horas à temperatura ambiente. Após três lavagens, adicionou-se 100 µl de estreptoavidina-peroxidase diluída 1:200 em PBS-BSA 1%, incubando-se por 20 minutos, temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, adicionou-se 100 µl do reagente A+B provido no kit, contendo o cromógeno, TMB, e o substrato da enzima, peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos de incubação, temperatura ambiente e no escuro, a reação foi interrompida com a solução de parada presente no kit, contendo ácido sulfúrico. A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Os valores das absorbâncias das amostras foram subtraídos do branco e interpolados com a curva padrão. O resultado foi expresso em picograma de citocinas por mg de tecido.

### **5.13 Western Blot para análise da expressão de TNF- $\alpha$**

Os fragmentos de intestino foram homogeneizados em tampão de lise e coquetel de inibidor de proteases. A concentração proteica foi determinada através do método BCA e as amostras armazenadas a -80°C até à sua utilização (SMITH *et al.*, 1985). O homogeneizado foi centrifugado e utilizado como extrato citosólico no Western blot. As mesmas quantidades de proteínas citosólicas foram separadas por eletroforese e os géis, posteriormente transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com tampão TBS-T/leite desnatado 5%, e incubadas com anticorpo primário TNF (Abcam) e conjugado secundário. A marcação com GAPDH (Sigma-Aldrich) foi utilizada como referência experimental. O anticorpo utilizado foi solubilizado em uma solução de BSA (5%) na concentração de 1:1000, com exceção do GAPDH (1:10.000), e o anticorpo secundário foi diluído na concentração de 1:2000. A revelação das bandas proteicas foi realizada utilizando o reagente ECF (Amersham) em Typhoon FLA 9000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia).

#### 5.14 Expressão do RNA mensageiro para IL-17A por PCR em tempo real

Amostras de íleo de 0,5 cm de comprimento foram utilizadas para determinar a expressão relativa de *Il-17A* mRNA. Inicialmente o RNA foi extraído conforme especificações do fabricante por meio do kit de extração *Aurum™ Total RNA fatty and fibrous tissue kit* (Bio-Rad, CA, USA). O rendimento e qualidade do RNA total foram verificados por meio de quantificação espectrofotométrica nos comprimentos de onda de 260 nm e da razão 260/280 nm, respectivamente. 1µg de RNA total no volume final de 20 µl foram transcritos reversamente por meio do kit *iScript™* (Bio-Rad) em cDNA utilizando o sistema termociclador *C1000 Touch™*. O PCR em tempo real foi realizado no equipamento *CFX96 Touch™* da Bio-Rad utilizando o *supermix iQ™ SYBR* (Bio-Rad), de acordo com as especificações do fabricante. A expressão do mRNA foi determinada após a normalização dos valores com o do gene de referência *Ppia*. A expressão relativa foi realizada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Abaixo é mostrada a sequência dos *primers* utilizados.

Foward: CCCTCTGTGATCTGGGAAGC

Reverse: TCTCAGGCTCCCTCTTCAGG

#### 5.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos por meio da média  $\pm$  erro padrão da média para dados paramétricos e como mediana com mínimo e máximo para dados não-paramétricos. Aos dados quantitativos contínuos foi aplicado o teste de normalidade D' Agostino e Pearson. Os dados aderiram à curva normal de acordo com este teste e foram utilizados, portanto, testes paramétricos, tais como: ANOVA com o pós-teste Tukey, para análises de comparação de médias entre mais de dois grupos, e, teste de Pearson, para as análises de correlação. Para análise de correlação com dados não paramétricos utilizou-se o teste de Spearman. Os dados não paramétricos, como escores de diarreia e histopatológico, foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste Dunn. O teste Mantel-Cox log rank foi utilizado para avaliar a diferença entre as curvas de sobrevida. O nível de significância estatística foi aceito quando o valor de  $P < 0,05$ . Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 6.0 (La Jolla, CA, USA).

## 6. RESULTADOS

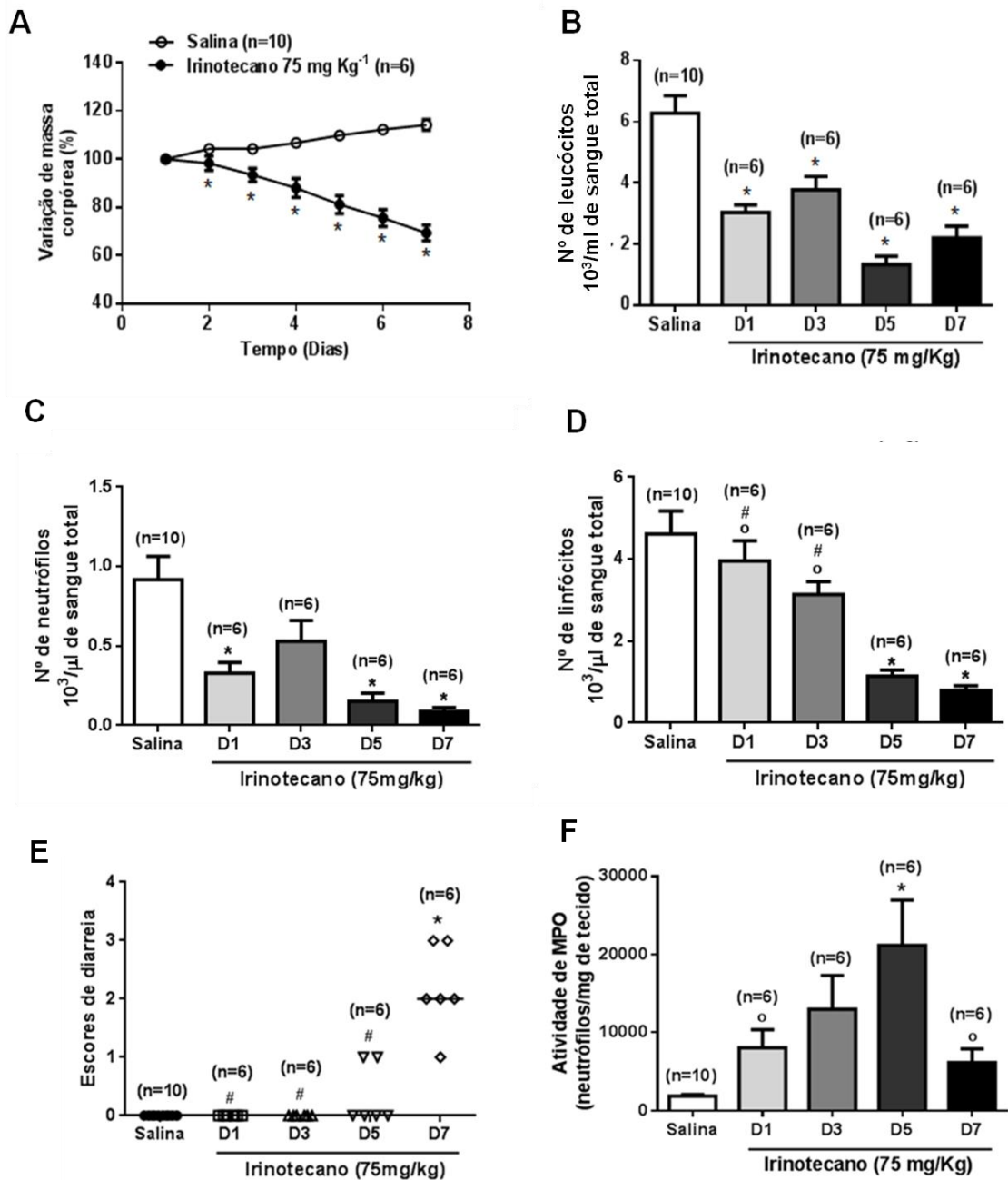
“Poucos médicos neste país parecem envolvidos com aqueles efeitos colaterais da terapia do câncer [...]. Nos Estados Unidos, calvície, náusea e vômito, diarreia, veias entupidas, problemas financeiros, casamentos desfeitos, filhos perturbados, perda da libido, da autoestima e da imagem corporal pertencem ao campo de trabalho dos enfermeiros (Rose Kushner, 1984).

### 6.1 Cinética de indução da mucosite experimental por irinotecano

A administração de irinotecano na dose 75mg/kg induziu significativa ( $P<0,05$ ) perda de peso nos animais a partir do segundo dia experimental quando comparado ao grupo controle. Uma redução ponderal de aproximadamente 30% foi observada no sétimo dia após a injeção do irinotecano. Em contrapartida, os animais do grupo controle ganharam peso ao longo do tempo (Figura 17A). A leucopenia foi evidente a partir do primeiro dia de indução da mucosite e perdurou ao longo dos sete dias de acompanhamento (D1:  $3,02\pm 0,25$ ; D3:  $3,76\pm 0,44$ ; D5:  $1,33\pm 0,27$ ; D7:  $2,2\pm 0,38$ ) em comparação ao grupo controle ( $6,27\pm 0,57$ ;  $P<0,05$ ) (Figura 17B). O número de neutrófilos totais sanguíneos decaiu após a primeira dose de irinotecano, mantendo-se baixo nos dias 5 e 7 (Salina:  $0,92\pm 0,14$  vs D1:  $0,32\pm 0,06$ ; D5:  $0,15\pm 0,05$ ; D7:  $0,08\pm 0,025$ ;  $P<0,05$ ), conforme ilustrado na imagem 17C. Além de neutropenia os animais apresentaram expressiva linfopenia a partir do quinto dia experimental (Salina:  $4,6\pm 0,55$  vs D5:  $1,15\pm 0,15$ ; D7:  $0,8\pm 0,11$ ;  $P<0,05$ ) (Figura 17D). Adicionalmente, os animais que receberam irinotecano desenvolveram significativa diarreia ( $P<0,05$ ) que foi evidente no sétimo dia após a primeira dose [2(1-3)] quando comparado com grupo que recebeu apenas salina como veículo [0(0-0)], como podemos observar na figura 17E. Contrariamente ao observado para os escore de diarreia, a atividade da enzima MPO, expressa por meio do número de neutrófilos por mg de tecido, atingiu o pico no quinto dia após a injeção do irinotecano quando comparado com os animais que receberam salina (D5:  $21.171\pm 5.779$ ; Salina:  $1.873\pm 190,6$ ;  $P<0,05$ ) e decaiu cerca de 70% no sétimo dia (D7:  $6.163\pm 1.757$ ;  $P<0,05$  vs D5), como mostrado na figura 17F. O irinotecano induziu significativo dano intestinal (Figura 18A), com redução da razão vilos/criptas a partir do quinto

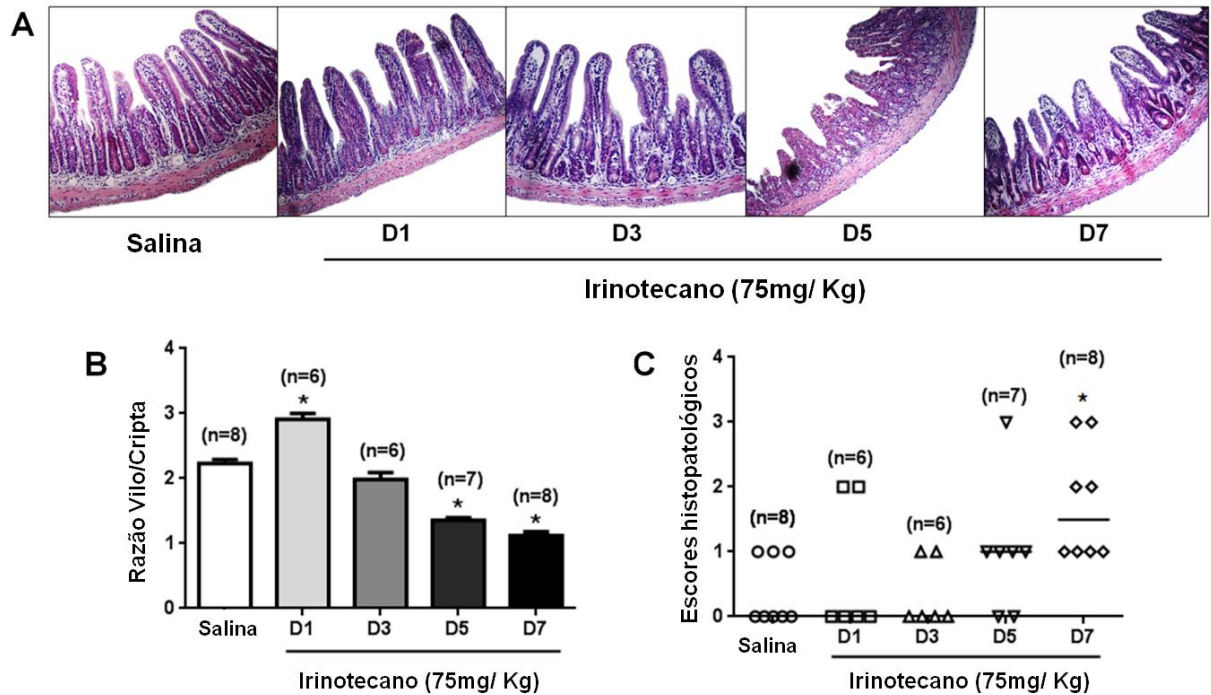
dia experimental (D5:  $1,35 \pm 0,03$ ; D7:  $1,12 \pm 0,06$  vs Salina:  $2,2 \pm 0,05$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 18B) e aumento dos escores histopatológicos no sétimo dia [D7: 1,5(1-3) vs Salina: 0(0-1);  $P < 0,05$ ] (Figura 18C).

Figura 17-Efeito da administração de irinotecano sobre a variação de massa corpórea, contagem de leucócitos sanguíneos, escores de diarreia e atividade de MPO.



Os animais receberam salina (5mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos. O peso e a diarreia foram avaliados diariamente. A eutanásia foi realizada nos dias (D)1, D3, D5 e D7. Foi coletado sangue venoso do plexo retro-orbital no dia da eutanásia para contagem de leucócitos e amostras de íleo para ensaio de mieloperoxidase (MPO). (A) O tratamento com irinotecano induziu significativa perda de peso, (B) redução do número de leucócitos, (C) redução do número de neutrófilos, (D) redução do número de linfócitos, (E) intensa diarreia e (F) infiltrado de neutrófilos no íleo. \*P<0,05 vs grupo salina; # P< 0,05 vs Dia7 (D7); °P<0.05 vs D5; # P<0.05 vs D7.

Figura 18-Alterações histopatológicas e morfométricas decorrentes da administração de irinotecano.



Os animais receberam salina (5mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos. Amostras de íleo foram coletadas após eutanásia nos dias (D) 1, D3, D5 e D7 e processadas para coloração com hematoxilina-eosina. (A) Os animais que receberam irinotecano apresentaram injúria intestinal progressiva (Aumento de 100x), (B) como demonstrado pela redução da razão vilo/cripta a partir do quinto dia experimental. (C) O dano tecidual também foi avaliado por meio de análise semi-quantitativa. \*  $P < 0,05$  vs grupo salina. One-Way ANOVA (Tukey) em A e Kruskal-Wallis (Dunn's) em B.

## 6.2 Frequência de células Treg e Th17 no intestino e baço dos animais ao longo do desenvolvimento da mucosite intestinal.

Inicialmente, avaliamos a frequência de células CD3<sup>+</sup> no intestino. Houve um decréscimo no percentual de célula T total após a injeção de irinotecano no primeiro, quinto e sétimo dia experimental quando comparado com o grupo salina (Salina: 73,21±2,5% vs D1:53,65±4,5%; D3:60,3±3,8%; D5: 35,6±3,7%; D7: 10,4±0,32%; P<0,05). Essa queda foi mais acentuada no sétimo dia em comparação ao demais dias (P<0,05) (Figura 19A). O mesmo comportamento foi observado com relação às células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Salina: 25,36±1,42% vs D1:18,28±1,06%; D3:28,02±2,8%; D5: 15,43±1,3%; D7: 8,77±0,32%; P<0,05) (Figura 19C).

A frequência de células Treg na lâmina própria intestinal, definida pela expressão dos marcadores CD3, CD4, CD25 e FOXP3, apresentou um aumento de 3x e 7x, respectivamente, no quinto e sétimo dia de desenvolvimento da mucosite (D5: 8,7±0,92%; D7: 18,7±3,13% vs Salina: 2,81±0,83%; P<0,05), conforme demonstrado na figura 20A. Esse aumento no percentual de Tregs é acompanhado pelo incremento na frequência de células Th17 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>), 2x no quinto dia e 3x no sétimo dia (D5: 22,4±2,84; D7: 28,23±4,16 vs Salina: 9,19±1,12; P<0,05) (Figura 20B). Além disso, ocorreu um aumento da razão %Treg/Th17 no intestino, evidente apenas no sétimo dia experimental (D7: 0,7±0,04 vs salina: 0,3±0,07; P<0,05) (Figura 20C). Esta razão correlacionou-se positivamente e moderadamente com parâmetros de gravidade da mucosite intestinal, como escore de diarreia (r= 0,7186; P=0,0121; figura 21A) e escore histopatológico (r=0,7841; P=0,0040; figura 21B).

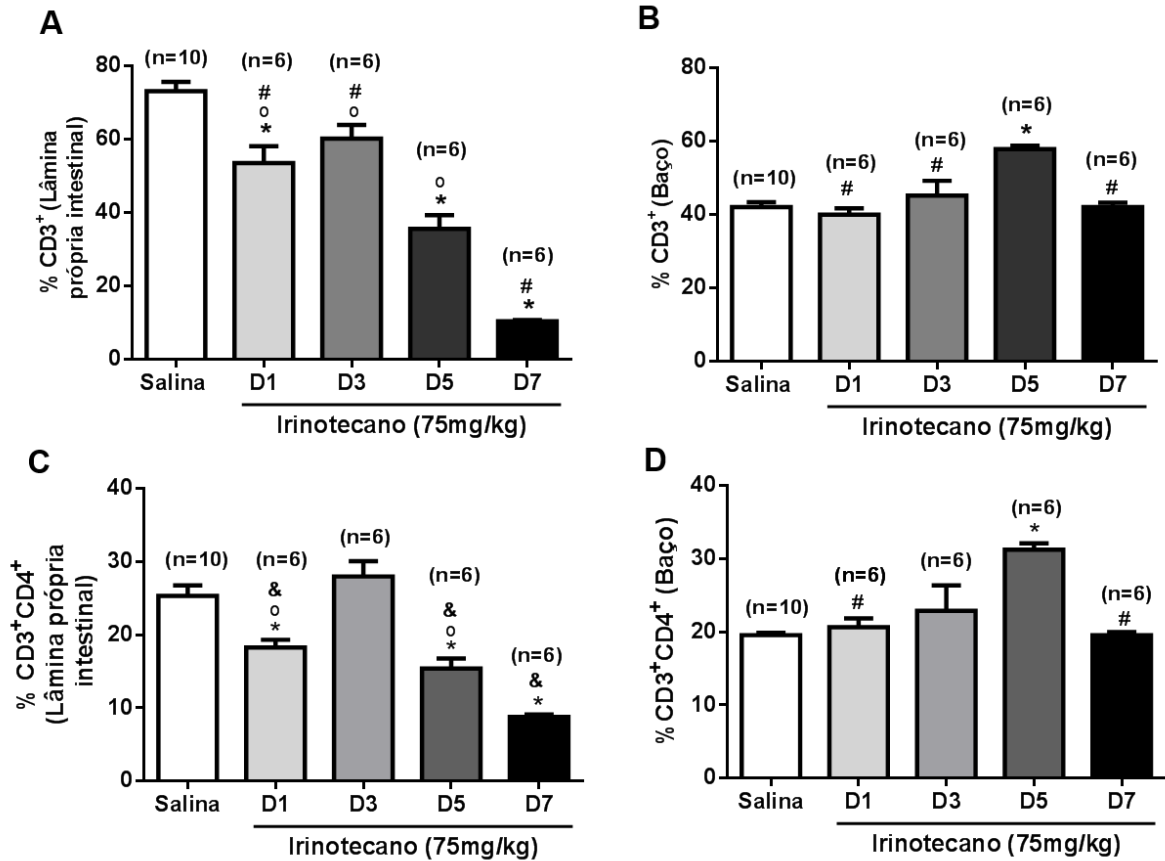
No baço, a frequência dos linfócitos T totais não diminuiu após a injeção do irinotecano, em contraste com o observado no intestino. Houve na verdade um aumento do no percentual de célula T CD3<sup>+</sup> apenas no quinto dia experimental (Salina: 42,1±1,4% vs D1: 40,03±1,74%; D3: 45,2±4,08%; D5: 58±0,98%; D7: 42,13±1,16%; P<0,05), retornando a níveis basais no sétimo dia (P<0,05) (Figura 19B). O mesmo foi observado com relação à frequência das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (Salina: 19,6±0,33% vs D1:20,7±1,2%; D3:22,9±3,5%; D5: 31,3±0,85%; D7: 19,6±0,42%; P<0,05) (Figura 19D).

Observou-se o aumento de cerca de 2x no número de células Treg e de cerca de 5x na frequência de células Th17 esplênicas no sétimo dia de indução da mucosite quando comparado com os animais do grupo controle injetados com salina (Treg: 7,51±1,1 vs

3,9±0,62, P<0,05/ Th17: 18,43±2,17 vs 4,04±0,63, P<0,05) (Figura 20D e 20E). Não houve diferença significativa na razão Treg/Th17 esplênica (Figura 20F), entretanto, observou-se uma tendência de redução nesta razão no sétimo dia experimental. De fato, houve uma correlação negativa fraca entre a taxa Treg/Th17 esplênica e os escores de diarreia ( $r = -0,4872$ ;  $P = 0,0091$ ; figura 21C) e histopatológico dos animais ( $r = -0,3934$ ;  $P = 0,0336$ ; figura 21C).

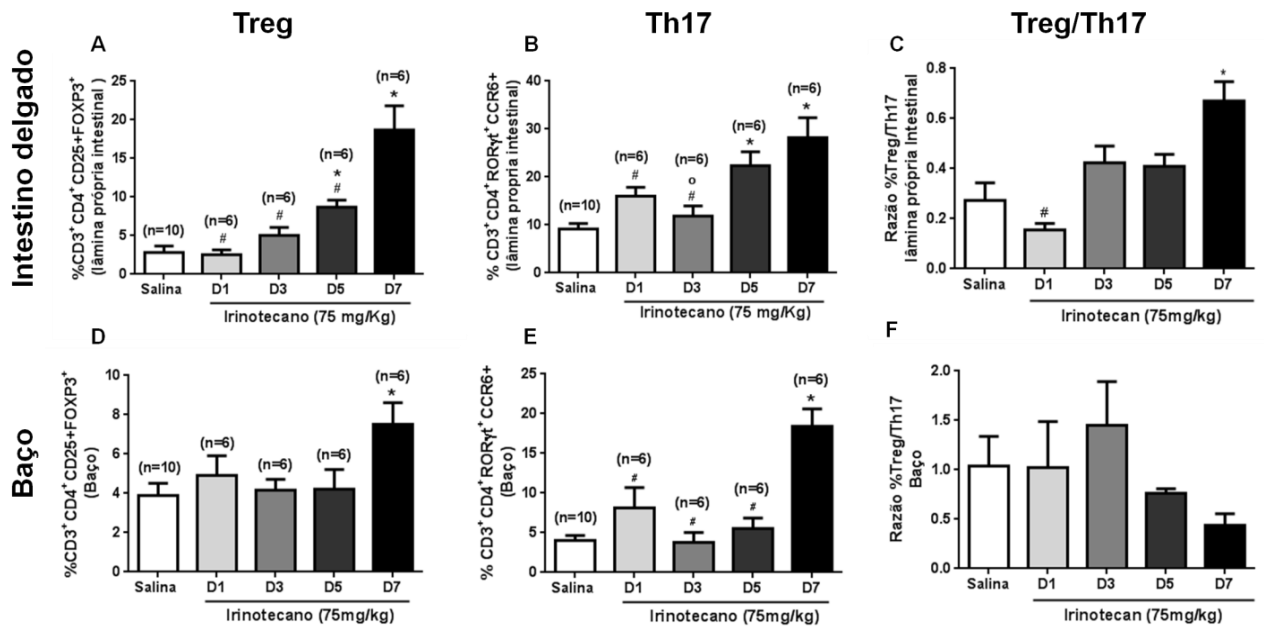


Figura 19-Alterações na frequência de células CD3<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, intestinais e esplênicas, durante o curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano.



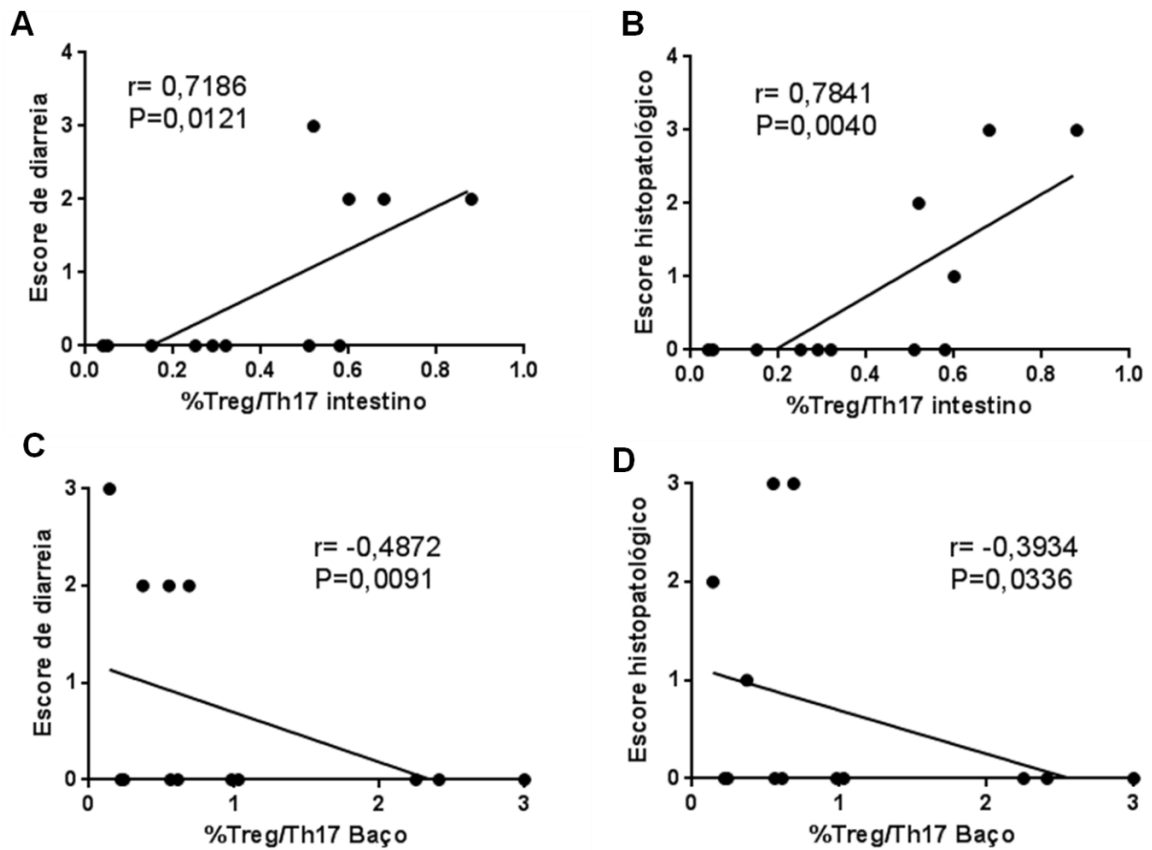
Os animais receberam salina (5mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite intestinal. O intestino delgado e baço foi coletado após eutanásia nos dias (D) 1, D3, D5 e D7, os linfócitos isolados e submetidos à imunofenotipagem por citometria de fluxo. (A) A frequência de células CD3<sup>+</sup> e (C) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> intestinais reduziu no primeiro, quinto e sétimo dia experimental. (B e D) No baço, não ocorreu redução no % de células T, havendo um aumento do % de células CD3<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no D5. \*P<0,05 vs grupo salina; & P<0,05 vs D3; #P<0,05 vs D5; °P<0,05 vs D7. One-Way ANOVA (Tukey).

Figura 20-Alterações na frequência de células Treg e Th17 durante o curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite intestinal. O intestino delgado e baço foi coletado após eutanásia nos dias (D) 1, D3, D5 e D7, os linfócitos foram isolados e submetidos à imunofenotipagem para identificação das células Treg e Th17. (A) A frequência de células Treg, (B) Th17, (C) bem como a razão entre elas, aumentou no intestino dos animais ao longo do desenvolvimento da mucosite. No baço, (D) observa-se o aumento apenas nos percentuais de células Tregs e (E) Th17, no sétimo dia experimental. (F) Não houve alteração significativa na razão Treg/Th17. \* P<0,05 vs grupo salina; #P<0,05 vs D7. One-Way ANOVA (Tukey).

Figura 21-Análise de correlação entre a razão %Treg/Th17 intestinal ou esplênica e parâmetros de gravidade da mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Os animais receberam salina (5mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite intestinal. O intestino delgado e baço foi coletado após eutanásia no sétimo dia, os linfócitos foram isolados e submetidos à imunofenotipagem para identificação das células Treg e Th17. A razão %Treg/Th17 intestinal correlacionou-se positivamente com escores de diarreia (A) e histopatológico (B). Contrariamente, houve uma correlação negativa entre razão %Treg/Th17 esplênica e esses parâmetros (C e D).  $P < 0,05$  considerado significativo. Teste de correlação de Spearman.

### **6.3 Células Tregs intestinais regulam positivamente a expressão de CD25 no sétimo dia de desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano**

O aumento na frequência de Tregs na lâmina própria intestinal, observado no sétimo dia após a injeção de irinotecano, ocorreu apenas na fração CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Como podemos observar na figura 22A, não há alteração no percentual de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, que inclui as frações CD25<sup>+</sup> e CD25<sup>-</sup>, nos animais com mucosite quando comparados ao controle (D7: 22,4±4,3% vs salina: 17±1,3%). Adicionalmente, observou-se uma menor frequência de células Tregs CD25<sup>-</sup> no grupo irinotecano (D7: 12,2±1,5% vs salina: 16,8±1,5%; P<0,05) (Figura 22C). Além disso, evidenciou-se que a célula Treg mais prevalente no intestino dos animais saudáveis é a subpopulação CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Ao longo do desenvolvimento da mucosite intestinal essa subpopulação vai decaindo em frequência e aumentando a fração CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, como demonstrado pelo aumento da razão entre os percentuais de Tregs CD25<sup>+</sup>/Tregs CD25<sup>-</sup> no intestino no quinto e sétimo dia experimental (Figura 22F). Esses achados sugerem que as células Tregs intestinais regulam positivamente a expressão de CD25 sete dias após a primeira dose de irinotecano. De fato, houve um aumento de cerca de 2x na média de intensidade de fluorescência para CD25 (MFI- Figura 22B, D e E) nesses animais quando comparados aos controles (D7: 40,7±3,5 vs salina: 19,3±2,5; P<0,05). Não se observou diferença significativa na média de intensidade de fluorescência para FOXP3 nas células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> entre o grupo irinotecano no sétimo dia e o grupo salina (D7: 247±8,3 vs salina: 271±26, dados não-mostrados).

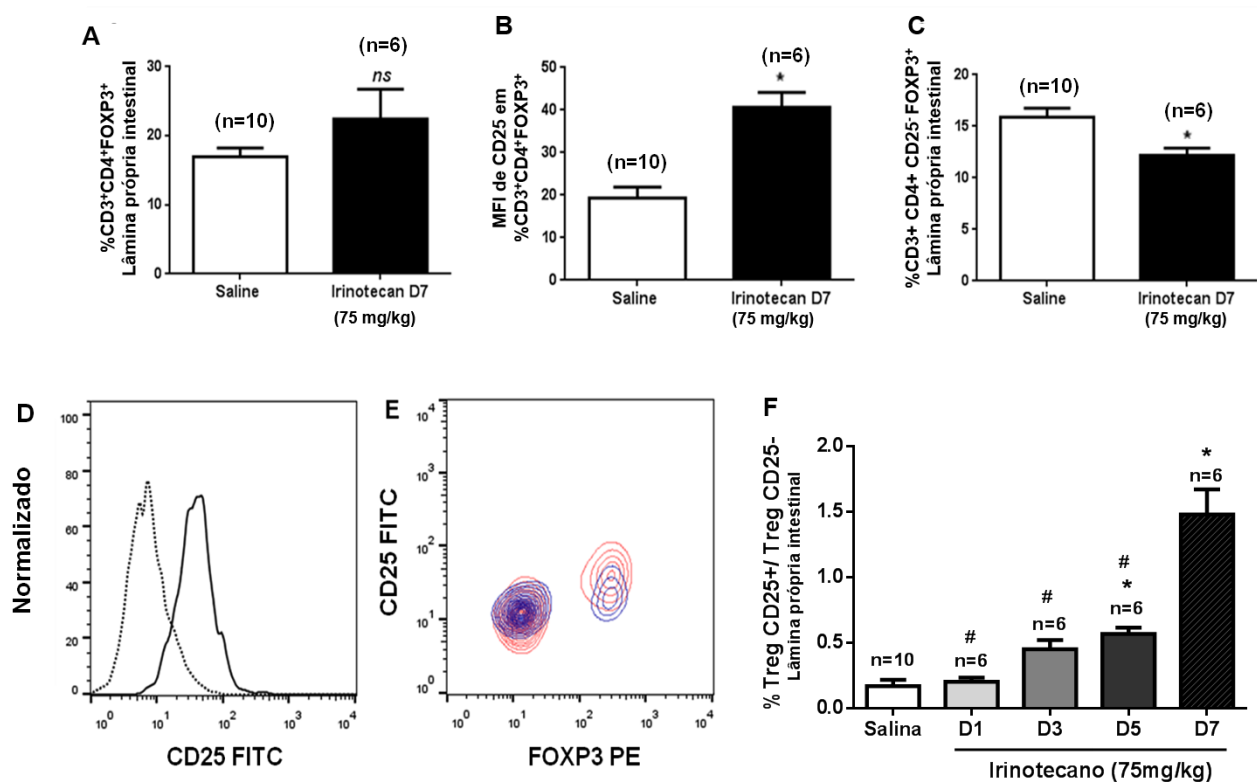
### **6.4 Baixa dose de ciclofosfamida ocasiona depleção das células T regulatórias intestinais e esplênicas.**

Inicialmente, avaliamos o impacto da depleção das Tregs com ciclofosfamida sobre a frequência dos linfócitos CD3<sup>+</sup> intestinais e esplênicos (Figura 23A e B). Os animais com mucosite depletados de Tregs tiveram um aumento significativo nos percentuais de linfócitos T, quando comparados àqueles que não receberam irinotecano [Intestino: (IRI: 10,42 ± 0,32 vs CYC+IRI: 46,22 ± 4,4); Baço: (IRI: 42,13 ± 1,16 vs CYC+IRI: 64,37 ± 1,29); P<0,05]. A frequência das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> comporta-se de forma semelhante (Figura 23C e D), com exceção ao aumento que ocorre nos percentuais dessas células nos animais que receberam ciclofosfamida isoladamente, quando comparados ao grupo salina [Intestino: (IRI: 8,76 ± 0,33 vs CYC+IRI: 25,26 ± 1,1 / Salina: 25,36 ± 1,4 vs CYC: 31,08

$\pm 1,76$ ); Baço: (IRI:  $19,6 \pm 0,42$  vs CYC+IRI:  $25,32 \pm 2,5$  / Salina:  $19,6 \pm 0,33$  vs CYC:  $25,95 \pm 2,4$ );  $P < 0,05$ ].

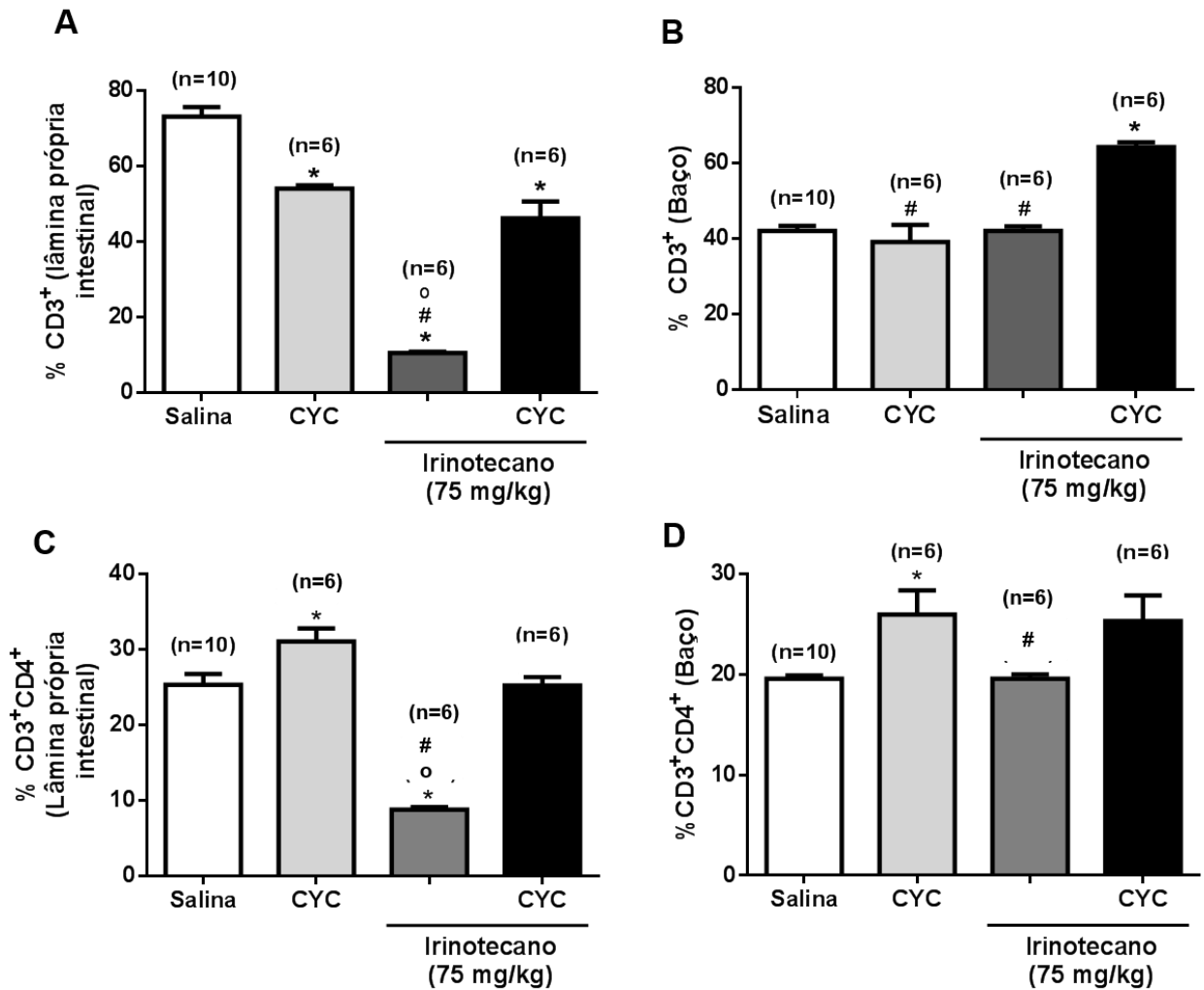
O pré-tratamento com ciclofosfamida (CYC), na dose única de 100mg/kg, ocasionou a depleção de 93% das células Tregs da lâmina própria intestinal dos animais com mucosite por irinotecano (IRI) no sétimo dia experimental (CYC+IRI:  $1,36 \pm 0,32$  vs IRI:  $18,7 \pm 3,13$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 24A e B). Esta depleção foi acompanhada pelo decréscimo na média de intensidade de fluorescência do FOXP3, como demonstrado na figura 24C (CYC+IRI:  $178 \pm 7,01$  vs IRI:  $247 \pm 8,4$ ;  $P < 0,05$ ). À nível esplênico também se observou uma redução, de cerca de 80%, na frequência de células Tregs nos animais com mucosite intestinal no sétimo dia após a injeção de ciclofosfamida quando comparados àqueles que não receberam a ciclofosfamida (CYC+IRI:  $1,4 \pm 0,24\%$  vs IRI:  $7,3 \pm 2,4\%$ ;  $P < 0,05$ ; dados não mostrados). Curiosamente, animais com mucosite depletados de Tregs apresentaram uma redução parcial, de cerca de 40%, na frequência de células Th17 intestinais, quando comparados aos animais com mucosite que não receberam ciclofosfamida (CYC+IRI:  $16,75 \pm 2,45\%$  vs IRI:  $28,24 \pm 4,16\%$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 24A e D).

Figura 22-Aumento na expressão de CD25 nas células Tregs intestinais dos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.



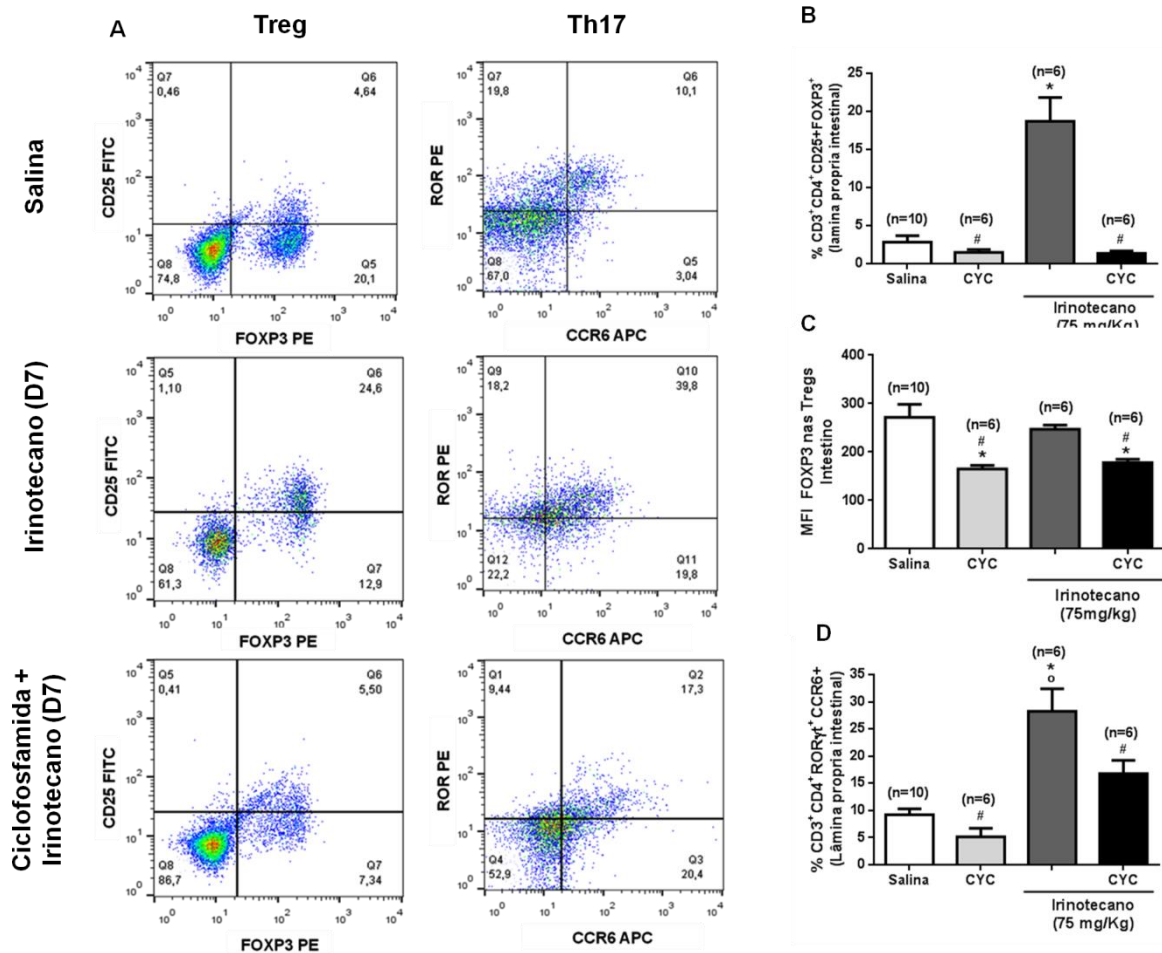
Os animais receberam salina (5mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos. O intestino delgado foi coletado após eutanásia no sétimo dia (D7), os linfócitos foram isolados e submetidos à imunofenotipagem para identificação das células Treg. (A) Não houve diferença na frequência de células Tregs CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, que inclui as frações CD25<sup>+</sup> e CD25<sup>-</sup>, entre o grupo irinotecano e o controle salina. (B, D e E). Observou-se um aumento na média de intensidade de fluorescência (MFI) para CD25 nas células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> nos animais injetados com irinotecano, (C) acompanhado pela redução no percentual de células Tregs CD25<sup>-</sup>. (D) A linha pontilhada representa animal salina e linha contínua um animal que recebeu irinotecano. (E) A cor azul representa o animal salina e a cor vermelha o animal irinotecano. (F) A razão entre os % Tregs CD25<sup>+</sup>/Tregs CD25<sup>-</sup> aumentou ao longo do desenvolvimento da mucosite. \*P<0,05 vs salina. Teste t de Student em A, B e C. One-Way ANOVA (Tukey) em F.

Figura 23-Alterações na frequência de células CD3<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, intestinais e esplênicas, após a depleção das Tregs com ciclofosfamida.



Os animais receberam salina (5mL/Kg, i.p) ou irinotecano (IRI, 75mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite intestinal. Para depleção das células Tregs, os animais foram injetados com ciclofosfamida isoladamente (CYC, 100 mg/kg, i.p, dose única) ou 2h antes da primeira dose de irinotecano. O intestino delgado e baço foi coletado após eutanásia no sétimo dia, os linfócitos isolados e submetidos à imunofenotipagem por citometria de fluxo. (A e C) A frequência de células T CD3<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> intestinais aumentou nos animais que sofreram a depleção das Tregs. (B e D) O mesmo é observado a nível sistêmico. \*P<0,05 vs grupo salina; #P<0,05 vs CYC+IRI; °P<0,05 vs CYC. One-Way ANOVA (Tukey).

Figura 24-Depleção de células Tregs com ciclofosfamida nos animais com mucosite induzida por irinotecano.



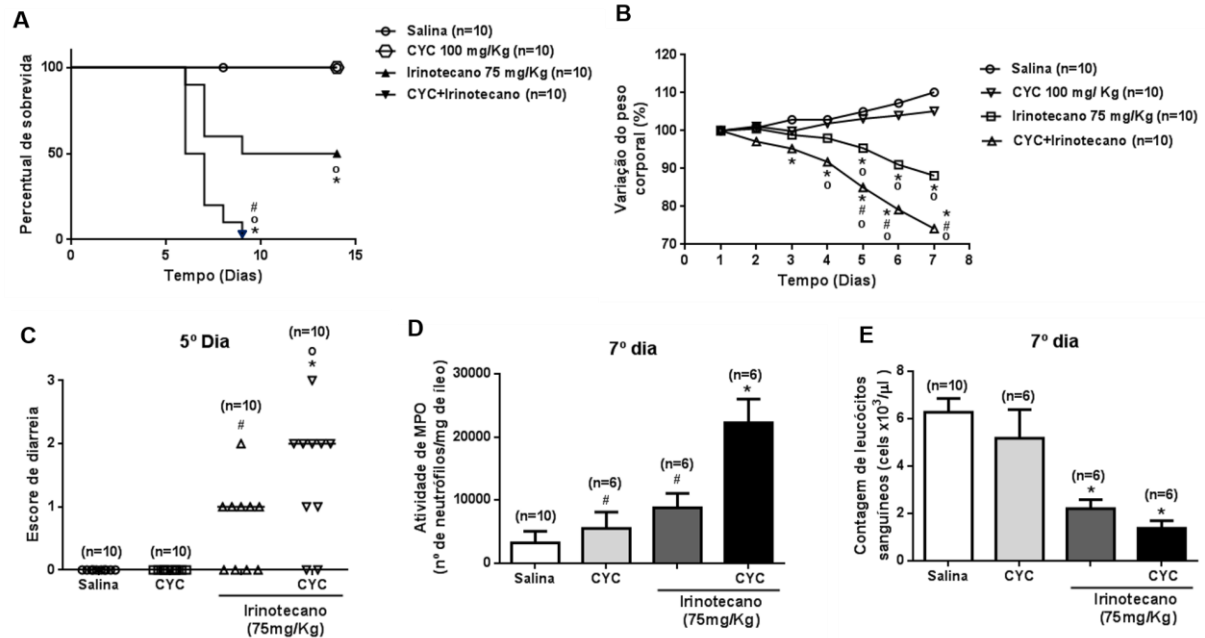
Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou ciclofosfamida (CYC, 100 mg/kg, i.p, dose única) isoladamente como controle. A mucosite foi induzida com a administração de irinotecano (75 mg/kg, 1x/dia, por 4 dias consecutivos, i.p). Para depleção das Tregs os animais foram injetados com CYC (100 mg/kg, i.p, dose única) 2h antes da primeira dose de irinotecano. O intestino delgado foi coletado após eutanásia no sétimo dia (D7), os linfócitos isolados e submetidos à imunofenotipagem para identificação das células Treg e Th17. (A) Imagem representativa da frequência de Tregs (painel da esquerda) e células Th17 (painel da direita). (B) A ciclofosfamida em baixa dose ocasiona a depleção das células Tregs, (C) bem como a redução da média de intensidade de fluorescência (MFI) para FOXP3 nestas células nos animais com mucosite por irinotecano. (D) Ocorreu também uma depleção parcial no percentual de células Th17 nesses animais. \*P<0,05 vs salina; # P<0.05 vs. Irinotecano; ° P <0.05 vs. CYC. One-Way ANOVA (Tukey).



### **6.5 A depleção das células Tregs com ciclofosfamida agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano**

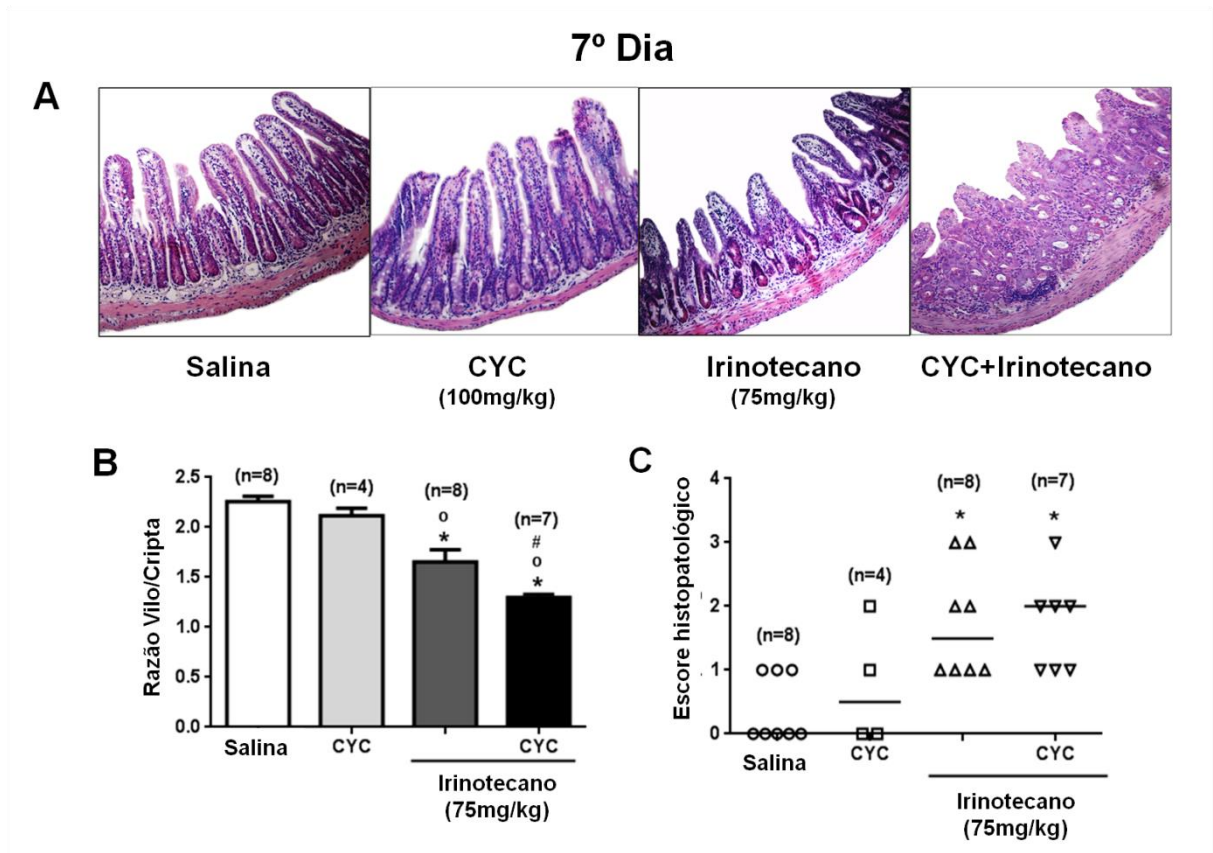
A depleção das Tregs aumentou a mortalidade dos animais com mucosite, sendo observado 100% de mortalidade no nono dia experimental, enquanto que 50% daqueles com mucosite não-depletados sobreviveram até o último dia de acompanhamento (14º dia) (Figura 25A,  $P < 0,05$ ). Adicionalmente, observou-se maior perda ponderal nos animais depletados de Tregs quando comparados aos não depletados a partir do quinto dia experimental, perdurando até o sétimo dia (Figura 25B;  $P < 0,05$ ). A depleção de Tregs exacerbou a diarreia dos animais injetados com irinotecano, a qual se tornou evidente mais cedo, no quinto dia experimental, quando comparados aos animais com mucosite não depletados [CYC+IRI: 2(0-3) vs IRI: 1(0-2);  $P < 0,05$ ] (Figura 25C). O número de neutrófilos por mg de íleo aumentou no sétimo dia após a depleção das Tregs nos animais injetados com irinotecano quando comparados aos não-depletados [CYC+IRI:  $22.254 \pm 3.757$  vs IRI:  $8.791 \pm 2.272$ ;  $P < 0,05$ ] (Figura 25D). Paralelamente a isto, os animais que receberam ciclofosfamida e irinotecano apresentaram menor razão vilo/cripta quando comparados aos injetados apenas com irinotecano, como mostrado na figura 26A e B (CYC+IRI:  $1,3 \pm 0,02$  vs IRI:  $1,7 \pm 0,12$ ;  $P < 0,05$ ), apesar de não haver diferença significativa entre os escores histopatológicos desses dois grupos [(CYC+IRI: 2 (1-3) vs IRI: 1,5 (1-3)] (Figura 26C). A injeção de ciclofosfamida isoladamente não causou perda de peso, leucopenia, mortalidade, diarreia, acúmulo de neutrófilos no intestino ou dano histopatológico nos animais (Figura 25 e 26).

Figura 25-Depleção de Tregs com ciclofosfamida agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou ciclofosfamida (CYC, 100 mg/kg, i.p, dose única) isoladamente como controle. A mucosite foi induzida com a administração de irinotecano (75 mg/kg, 1x/dia, por 4 dias consecutivos, i.p). Para depleção das Tregs os animais foram injetados com CYC (100 mg/kg, i.p, dose única) 2h antes da primeira dose de irinotecano. O intestino delgado (íleo) foi coletado após eutanásia no sétimo dia 7. Para o experimento de sobrevivência os animais foram acompanhados até o 14º dia após a primeira dose de irinotecano. (A e B) A depleção de Tregs aumentou a mortalidade (A) e a perda ponderal (B) dos animais com mucosite, (C) agravou a diarreia e (D) aumentou o número de neutrófilos no íleo desses animais. (E) Não ocorreu potencialização da leucopenia com a injeção de ciclofosfamida. \* $P < 0.05$  vs. Salina; #  $P < 0.05$  vs. CYC+ Irinotecano; °  $P < 0.05$  vs. CYC. Teste de Mantel-Cox em A. Two-way ANOVA em B. Kruskal-Wallis (Dunn's) em C. One-Way ANOVA (Tukey) em D e E.

Figura 26-Alterações histopatológicas e morfométricas decorrentes da depleção de Tregs nos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

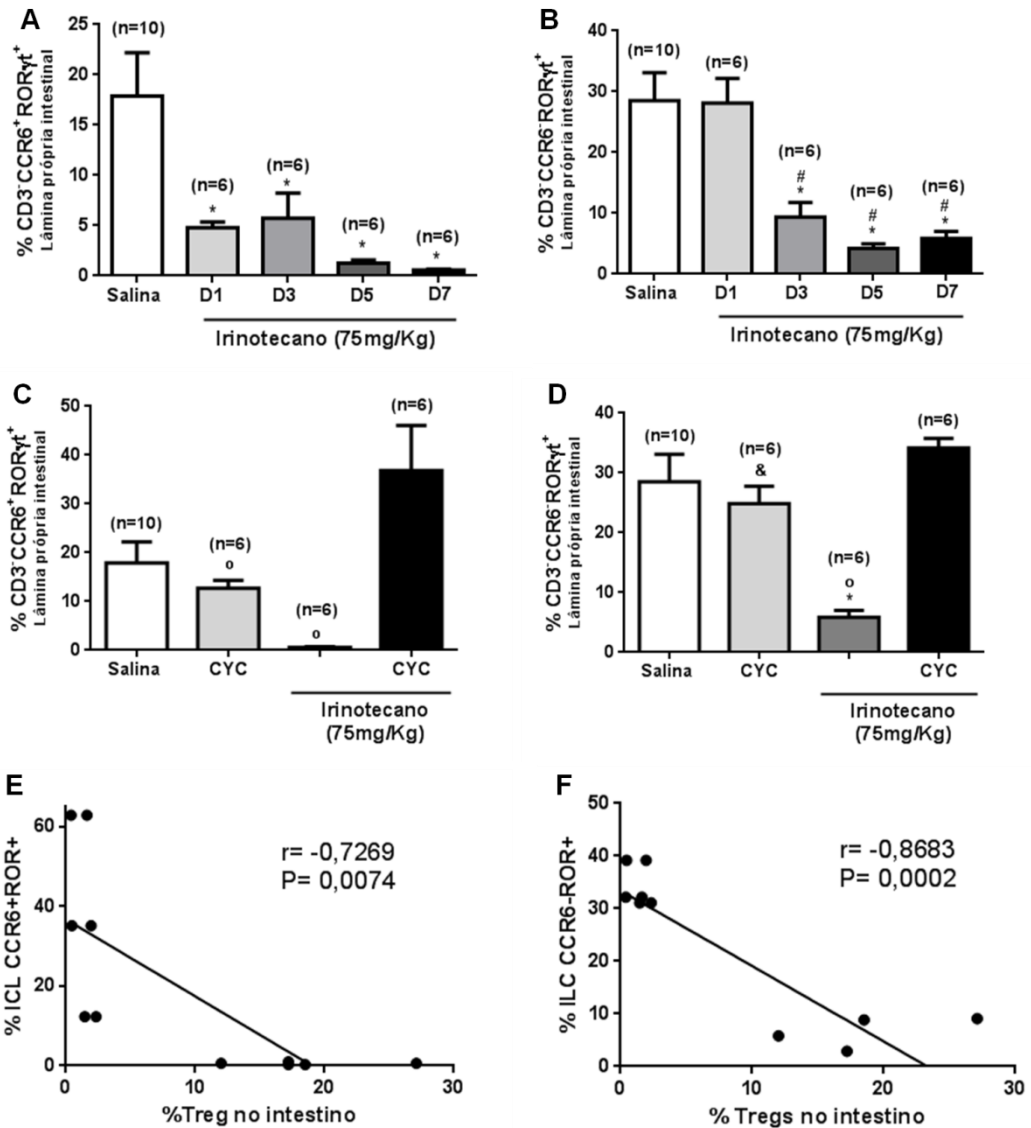


Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou ciclofosfamida (CYC, 100 mg/kg, i.p, dose única) isoladamente como controle. A mucosite foi induzida com a administração de irinotecano (75 mg/kg, 1x/dia, por 4 dias consecutivos, i.p). Para depleção das Tregs os animais foram injetados com CYC (100 mg/kg, i.p, dose única) 2h antes da primeira dose de irinotecano. O intestino delgado (íleo) foi coletado após eutanásia no sétimo dia 7 e processado para análise histopatológica e morfométrica. (A e B, aumento de 100x). A depleção de Tregs ocasionou maior redução da razão vilo/cripta, (C) não havendo alteração significativa nos escores histopatológicos. \* $P < 0.05$  vs. salina. °  $P < 0.05$  vs. CYC e # $P < 0.05$  vs. Irinotecano. One-Way ANOVA (Tukey) em A e Kruskal-Wallis (Dunn's) em B.

### **6.6 Frequência de células linfoides inatas do tipo 3 (ICL3) no intestino dos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano, depletados ou não de Tregs.**

Observamos dois fenótipos distintos de ICL3 no intestino dos animais C57BL/6:  $CD3^+CCR6^+ROR\gamma^+$  e  $CD3^+CCR6^-ROR\gamma^+$ . A frequência de ambas as subpopulações reduz significativamente ao longo do desenvolvimento da mucosite intestinal, com as células  $CCR6^+$  decaindo a partir do primeiro dia após a injeção de irinotecano (D1:  $4,7 \pm 0,55\%$  / D3:  $5,7 \pm 2,4\%$  / D5:  $1,26 \pm 0,3\%$  / D7:  $0,55 \pm 0,1\%$  vs salina:  $17,9 \pm 4,13$ ;  $P < 0,05$ ) e as células  $CCR6^-$  a partir do terceiro dia (D3:  $9,36 \pm 2,4\%$  / D5:  $4,2 \pm 0,7\%$  / D7:  $5,9 \pm 1,1\%$  vs salina:  $28,5 \pm 4,5$ ;  $P < 0,05$ ) (Figura 27A e B, respectivamente). Nos animais com mucosite que sofreram a depleção de Tregs com ciclofosfamida a frequência de ambas as subpopulações de ICL3 aumenta consideravelmente quando comparada a dos animais com mucosite que não receberam a ciclofosfamida [ICL  $ROR^+$  (CYC+IRI:  $36,8 \pm 9,2$  vs IRI:  $0,55 \pm 0,1\%$ ;  $P < 0,05$ ) e ICL  $ROR^-$  (CYC+IRI:  $34,17 \pm 1,6\%$  vs IRI:  $5,9 \pm 1,1\%$ ;  $P < 0,05$ )] (Figura 27C e D). Diante desses achados, realizamos uma análise de correlação entre as diferentes subpopulações de ICL3 e as células Tregs desses animais com mucosite no sétimo dia experimental. De fato, houve uma correlação negativa moderada entre as células ICL3  $CCR6^+$  e o % de Tregs intestinais ( $r = -0,7269$ ;  $P = 0,0074$ ) e uma correlação negativa forte entre as células ICL3  $CCR6^-$  e a frequência de Tregs intestinais ( $r = -0,8683$ ;  $P = 0,0002$ ), sugerindo uma interação entre elas (Figura 27E e F, respectivamente).

Figura 27-Percentual de células linfoides inatas do tipo 3 (ICL3) intestinais ao longo do desenvolvimento da mucosite por irinotecano e após a depleção das Tregs.



Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite. O intestino delgado foi coletado após eutanásia nos dias (D)1, D3, D5 e D7, os linfócitos isolados e as células linfoides inatas do tipo 3 (ICL3) e Tregs identificadas por citometria de fluxo. Para depleção das células Tregs os animais receberam ciclofosfamida (CYC, 100 mg/kg, i.p, dose única) isoladamente como controle ou CYC (100 mg/kg, i.p, dose única) 2h antes da primeira dose de irinotecano, sendo a eutanásia realizada no D7. Houve uma redução da frequência das células (A) ICL3 CCR6<sup>+</sup> e (B) ICL3 CCR6<sup>-</sup> ao longo do desenvolvimento da mucosite, (C e D) sendo este decréscimo revertido pela depleção das células Tregs. Ocorreu uma correlação negativa entre: (E) % de Tregs e o % das células ICL3 CCR6<sup>+</sup> e (F) % de Tregs e % de ICL3 CCR6<sup>-</sup>. \*P<0,05 vs salina; # P<0.05 vs. D1; <sup>o</sup> P<0.05 vs. CYC+IRI; & P<0,05 vs CYC. One-Way ANOVA (Tukey) de A-D. Pearson em E e F.

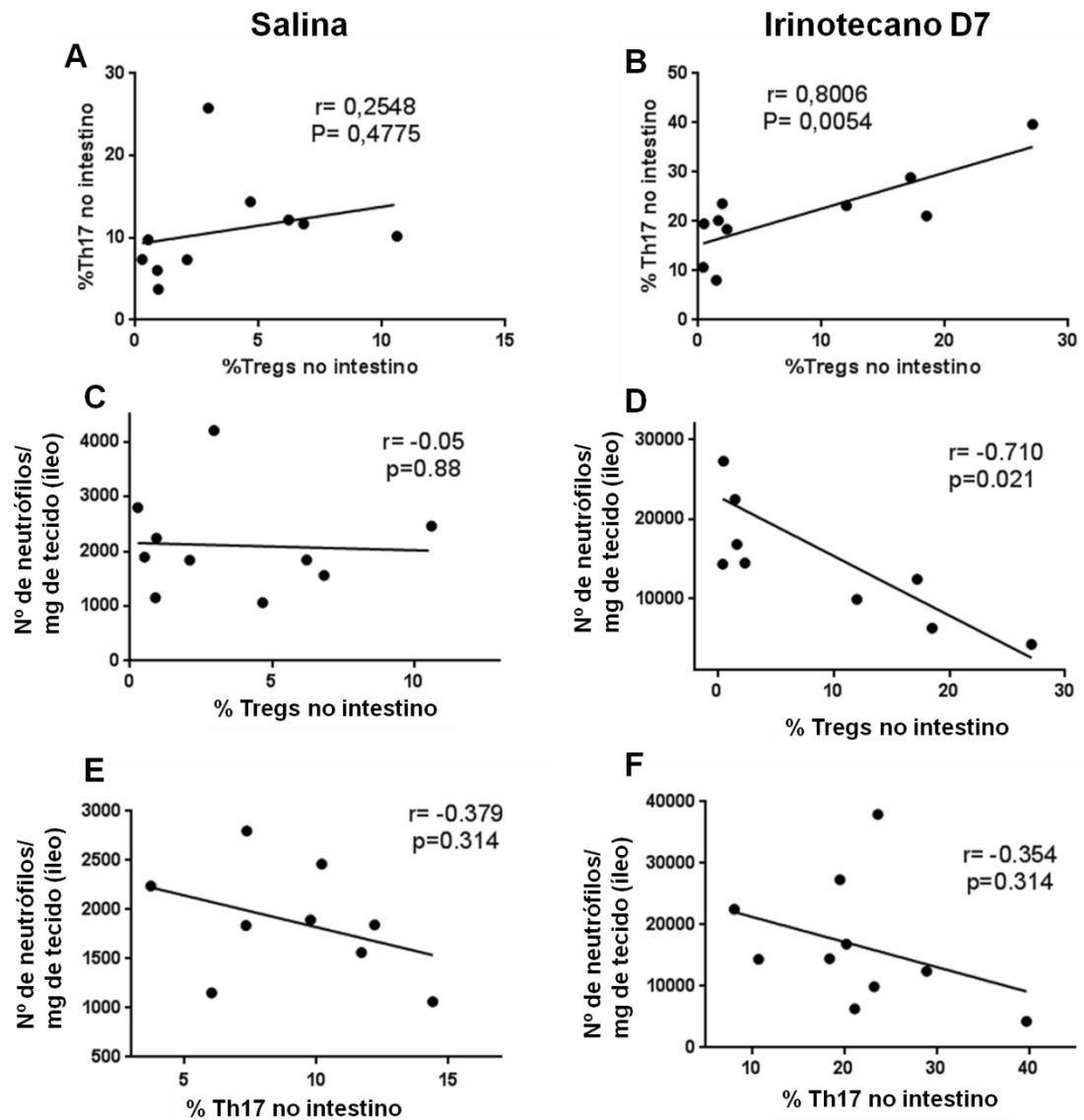
### **6.7 Correlação entre a frequência de Tregs ou células Th17 intestinais com número de neutrófilos teciduais.**

Os resultados anteriores (Figura 24D) mostram que a depleção de células Tregs com ciclofosfamida reduz também, embora parcialmente, a frequência de células Th17 intestinais. Diante disto, realizamos uma análise de correlação entre os percentuais dessas duas subpopulações linfocitárias. Curiosamente, houve uma correlação positiva forte ( $r=0,8006$ ;  $P=0,0054$ , Figura 28B) entre as células Tregs e Th17 intestinais dos animais com mucosite induzida por irinotecano no sétimo dia experimental. O mesmo não foi observado com o grupo injetado apenas com salina (Figura 28A).

Além disso, mostrou-se anteriormente que o pico de células Tregs no intestino ocorre no sétimo dia após a primeira injeção de irinotecano (Figura 20A). Neste momento, houve uma redução do número de neutrófilos intestinais (Figura 17D). De fato, houve uma correlação negativa moderada entre o número de neutrófilos e a frequência de Tregs intestinais no sétimo dia experimental ( $r= -0,710$ ;  $P=0,021$ , Figura 28D). Não houve correlação significativa entre estas células no grupo controle (Figura 28C).

Com intuito de avaliar o envolvimento de células Th17 no recrutamento dos neutrófilos neste modelo realizamos uma análise de correlação entre os percentuais dessas células. Não houve correlação significativa entre a frequência de células Th17 e o número de neutrófilos no sétimo dia experimental nos animais que receberam irinotecano (Figura 28F) e nem no grupo controle (28E).

Figura 28-Correlação entre a frequência de células Tregs, Th17 e número de neutrófilos no intestino.



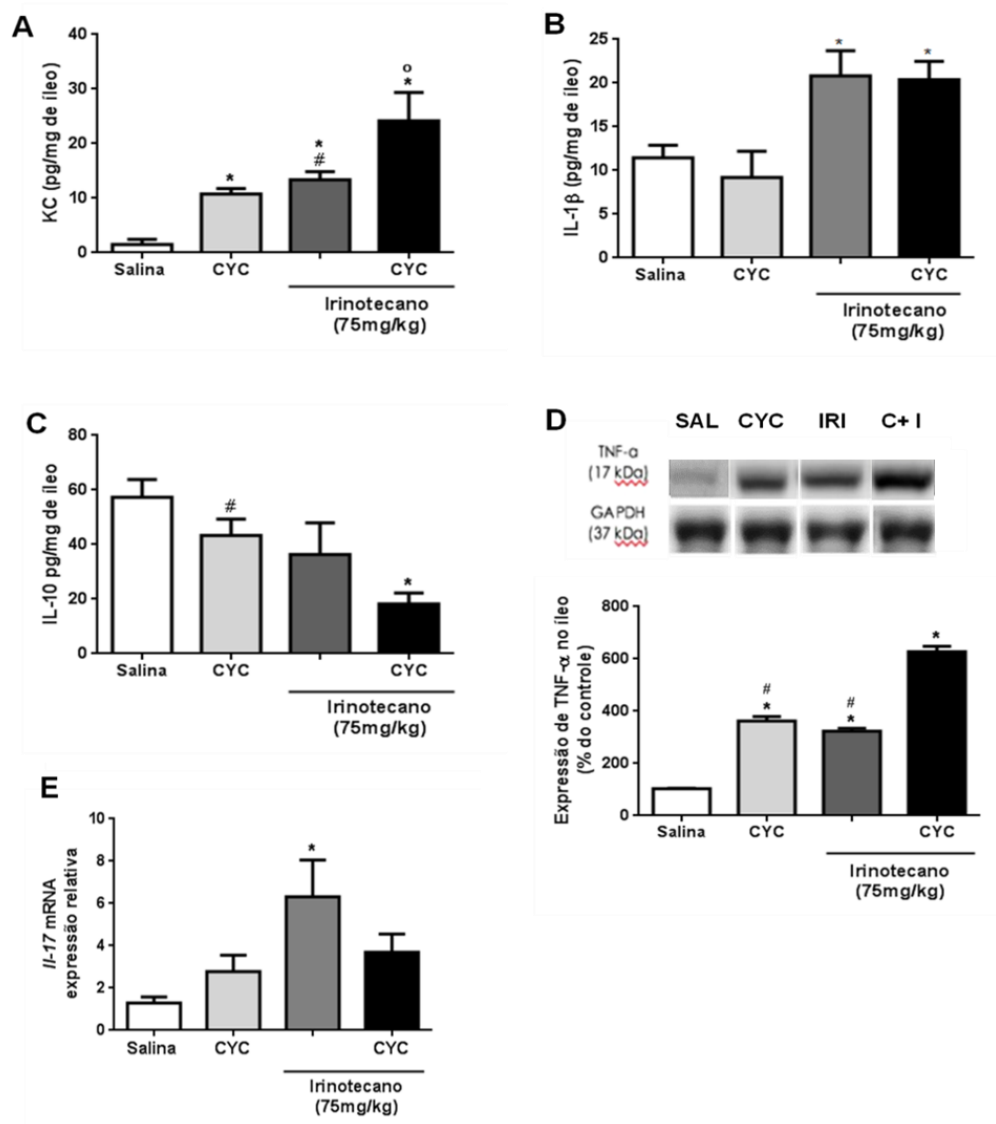
Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite experimental. O intestino delgado coletado após eutanásia no sétimo dia (D7), os linfócitos isolados e submetidos à imunofenotipagem para identificação das células Treg e Th17. (B) Houve uma correlação positiva entre a frequência Tregs e a frequência de células Th17 dos animais que receberam irinotecano, (A) mas não no grupo controle. (D) Além disso, houve uma correlação negativa entre o % de Tregs e o número de neutrófilos nos animais com mucosite. (C) O mesmo não foi observado no grupo controle. Não houve correlação entre a frequência de células Th17 e o número de neutrófilos intestinais (F) no grupo injetado com irinotecano e (E) nem no grupo salina.  $P < 0,05$  considerado significativo. Teste de correlação de Pearson.

### **6.8 Níveis das citocinas KC, IL-1 $\beta$ e IL-10 por ELISA, expressão de TNF- $\alpha$ por western blot e do mRNA para *IL-17A* no intestino dos animais com mucosite depletados ou não de Tregs.**

Os animais com mucosite intestinal apresentaram um aumento dos níveis teciduais das citocinas IL-1 $\beta$  e KC (pg/mg de tecido) e na expressão de TNF- $\alpha$  (% do controle) e de IL17A no íleo quando comparados aos animais injetados apenas com salina (IL-1  $\beta$ : 11,5 $\pm$ 1,4 vs 20,8 $\pm$ 2,9; P<0,05/ KC: 1,5 $\pm$ 0,9 vs 13,35 $\pm$ 1,52; P<0,05/ TNF: 103,1 $\pm$ 1,5 vs 323,5 $\pm$ 10; IL-17A: 1,29 $\pm$ 0,3 vs 6,32 $\pm$  1,7; P<0,05) (Figura 29A, B, D e E, respectivamente). A depleção de células Tregs com ciclofosfamida ocasionou o aumento nos níveis de KC (CYC+IRI: 24,18 $\pm$ 5,15 vs IRI: 13,35 $\pm$ 1,52; P<0,05) e na expressão de TNF $\alpha$  (CYC+IRI: 627,9 $\pm$ 20,5 vs IRI: 323,5 $\pm$ 10; P<0,05) (Figura 29A e D, respectivamente), não alterando os níveis de IL-1 $\beta$  (CYC+IRI: 20,38 $\pm$  2,11 vs IRI: 20,8 $\pm$ 2,9; P>0,05). Observamos apenas uma tendência à redução na expressão relativa de IL-17A nos animais com mucosite que receberam ciclofosfamida quando comparado aos que não receberam (CYC+IRI: 3,69 $\pm$ 0,85 vs IRI: 6,32 $\pm$  1,7; P>0,05) (Figura 29E). Com relação à citocina IL-10, não houve diferença significativa entre o grupo irinotecano e o grupo salina (IRI: 36,4 $\pm$ 11,52 vs salina: 57,4 $\pm$  6,5; P>0,05). Todavia, houve uma redução nos níveis dessa citocina nos animais depletados de Tregs que receberam irinotecano (CYC+ IRI: 18,25 $\pm$ 3,96 vs CYC: 43,37 $\pm$ 6,05 e vs salina: 57,4 $\pm$  6,5; P<0,05) quando comparado aos controles (Figura 29C).



Figura 29-Níveis de KC, IL1-beta e IL-10 e expressão de TNF-alfa e IL-17A no intestino dos animais com mucosite depletados ou não de Tregs.



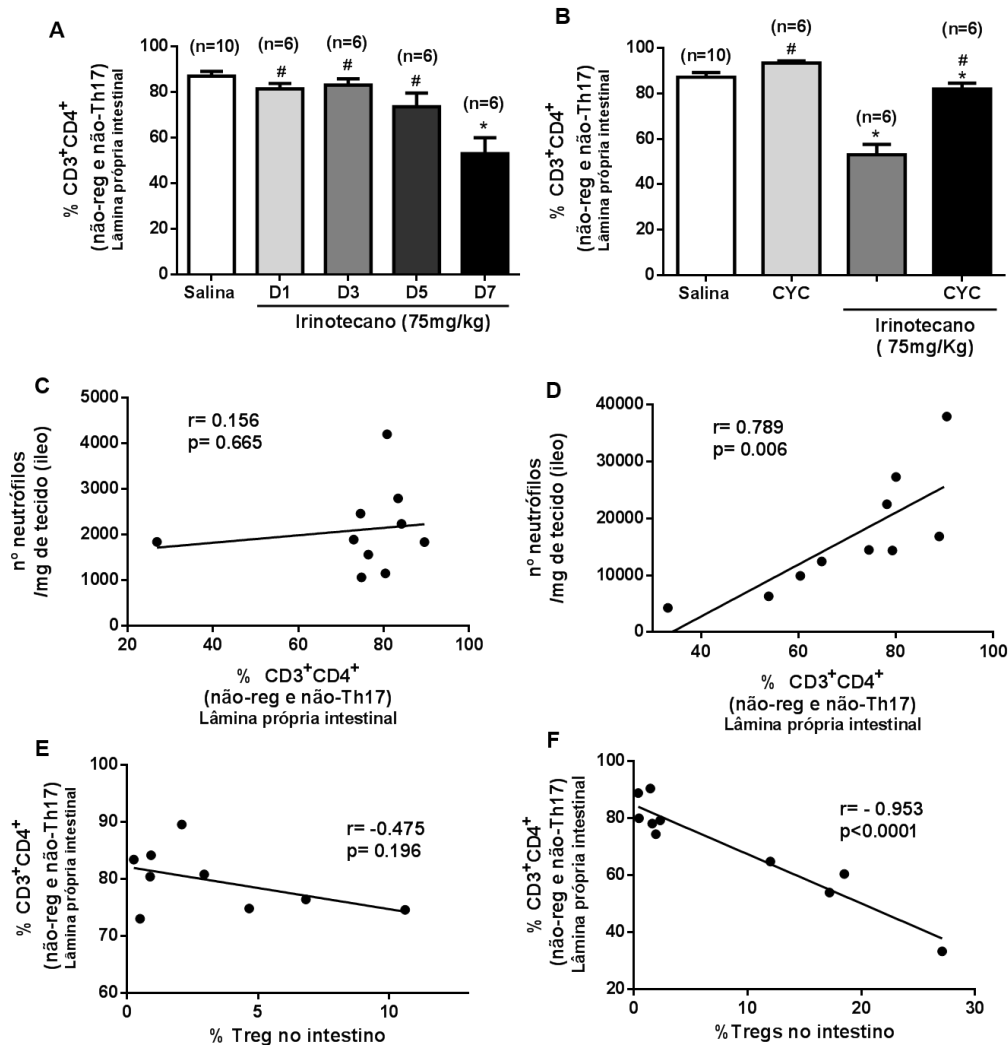
Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite. Para depleção das células Tregs os animais receberam ciclofosfamida, CYC (100 mg/kg, i.p, dose única), isoladamente ou 2h antes da primeira dose de irinotecano, com eutanásia no sétimo dia. Amostra de íleo foi obtida após eutanásia e processada para dosagem de IL-1β, KC e IL-10 por ELISA, expressão da proteína TNF-α por western blot e do RNAm para IL17 por PCR em tempo real. (A) Os animais que receberam irinotecano apresentaram níveis aumentados de KC quando comparados aos animais injetados com salina. A depleção de Tregs eleva ainda mais os níveis dessa citocina nos animais com mucosite. (B) Os níveis de IL-1β também se mostrou elevado nos animais do grupo irinotecano, o que não foi modificado pela depleção de Tregs. (C) A citocina IL-10 encontra-se reduzida apenas nos animais depletados de Tregs que receberam irinotecano. (D) A expressão da proteína TNF mostrou-se elevada no grupo irinotecano e foi potencializada nos animais depletados de Tregs. P<0,05 considerado significativo. One-Way ANOVA (Tukey).

### **6.9 Frequência de outras células T *helper*, não-Treg e não-Th17, no intestino dos animais com mucosite induzida por irinotecano.**

Questionamos se outras subpopulações de células Th não-Treg e não Th17 estariam alteradas nesse modelo. Essas células Th foram definidas pelo % de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> subtraído do % de células Tregs e Th17. A figura 30A aponta uma redução na frequência dessas células no sétimo dia experimental no intestino dos animais que receberam irinotecano quando comparados ao grupo controle (Salina: 87,14±2% vs D7: 53,08±6,9; P<0,05). A depleção de células Tregs com ciclofosfamida aumentou a frequência dessas outras subclasses de células Th no intestino dos animais com mucosite (Figura 30B) quando comparado aos não depletados (CYC+IRI: 81,89±2,6 vs IRI: 53,08±6,9; P<0,05). Adicionalmente, houve uma correlação negativa forte entre o percentual de células Th (não-Treg e não Th17) e a frequência de células Tregs intestinais, apenas nos animais injetados com irinotecano depletados ou não de Tregs ( $r = -0,953$ , P<0,0001; Figura 30F). Com relação ao número de neutrófilos, houve uma correlação positiva moderada entre eles e as células Th (não-Tregs e não-Th17) apenas nos animais com mucosite intestinal no sétimo dia experimental ( $r = 0,789$ ; P=0,006; Figura 30D).

A nível esplênico (dados não mostrados) a frequência das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> não-reg e não-Th17 oscila levemente ao longo dos dias de desenvolvimento da mucosite intestinal, decaindo no primeiro dia em comparação ao controle (P<0,05) e retornando a níveis basais no terceiro dia (P<0,05), onde perdura até o quinto com nova queda no sétimo dia (P<0,05) (Salina: 93,39±0,52; D1: 83,59±0,8; D3: 91±1,4; D5: 90,2±1,5; D7: 74,28±2,6). A depleção das células Tregs com ciclofosfamida evitou a queda na frequência dessas células no sétimo dia naqueles animais com mucosite (IRI: 74,28±2,6 vs CYC+IRI: 95,72±0,6; P<0,05).

Figura 30-Frequência de células Th não-Treg e não-Th17 nos animais com mucosite intestinal depletados ou não de Tregs.



Os animais receberam salina (5 mL/Kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg) uma vez ao dia, durante 4 dias consecutivos para indução da mucosite. A eutanásia foi realizada nos dias (D) 1, D3, D5 e D7. Para depleção das células Tregs os animais receberam ciclofosfamida, CYC (100 mg/kg, i.p, dose única), isoladamente ou 2h antes da primeira dose de irinotecano, com eutanásia no sétimo dia. Os linfócitos isolados foram submetidos à imunofenotipagem para identificação das células Treg e Th17. As células Th não-Treg e não Th17 foram definidas como o % de células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup> subtraído do % de células Th17. (A) Houve uma redução na frequência de células Th não-Treg e não Th17 intestinais no sétimo dia nos animais com mucosite não depletados de Tregs. (B) Com a depleção de células Tregs a frequência dessas células aumentou, (F) havendo uma correlação negativa entre os percentuais de Tregs e de Th nos animais que receberam irinotecano, (E) não sendo observada correlação no grupo salina. (D) Houve uma correlação positiva entre as células Th e o número de neutrófilos nos animais com mucosite (D), (C) mas não nos animais do grupo controle. \* vs salina; # vs IRI. P<0,05 considerado significativo. One-Way ANOVA (Tukey) em A e B. Pearson de C-F.

## 7. DISCUSSÃO

“A terapia do câncer equivale a espancar um cão com uma vara para livrá-los das pulgas”

(Anna Deaveare Smith)

No presente estudo, nós mostramos pela primeira vez o papel das células T regulatórias no controle do dano intestinal mediado pelo irinotecano, uma vez que a depleção dessas células com ciclofosfamida exacerbou o dano tecidual, aumentou a mortalidade, a diarreia, a perda ponderal e os níveis de citocinas pró-inflamatórias intestinais dos animais. Adicionalmente, verificamos a frequência de células Tregs, Th17, ILC3 e Th não-reg e não-Th17 no intestino dos animais com mucosite, antes e após a administração da ciclofosfamida.

Mostramos, além disso, o efeito da administração de irinotecano sobre a cinética dos parâmetros de variação de massa corpórea, contagem de leucócitos, escores histopatológicos, escores de diarreia e número de neutrófilos no intestino dos animais ao longo do tempo. A injeção de irinotecano ocasionou significativa perda de peso corporal, diarreia, infiltrado de neutrófilos no intestino, leucopenia, redução da razão vilosidade/cripta e dano intestinal, como demonstrado previamente por outros autores (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015). O pico da mucosite intestinal ocorreu no sétimo dia experimental, com exceção do infiltrado neutrofílico que teve seu pico no quinto dia. A intensa resposta inflamatória associada à injeção de irinotecano está relacionada ao desenvolvimento de alterações gastrointestinais como o retardo do esvaziamento gástrico e aceleração do trânsito intestinal que podem estar envolvidos no desenvolvimento da diarreia (BELARMINO-FILHO, 2010). A apoptose de células epiteliais intestinais, decorrente da ação citotóxica do irinotecano, ocasiona a atrofia de vilosidades, aprofundamento de criptas e consequente redução da razão vilosidade/cripta. Isto resulta em menor capacidade absorptiva e alteração na secreção de sódio e potássio, resultando em diarreia (KEEF *et al.*, 2007). Além disso, a quimioterapia pode alterar a composição da microbiota intestinal e a disbiose resultante pode influenciar no desenvolvimento de diarreia (MONTASSIER *et al.*, 2015; PEDROSO *et al.*, 2015). A

diarreia intensa, associada à presença de cólicas gastrointestinais culmina na perda acentuada de peso. A leucopenia aqui demonstrada, especialmente neutropenia e linfopenia, é um efeito colateral comum do irinotecano, decorrente da sua ação mielossupressora (HARDMAN *et al.*, 2002; GARREN *et al.*, 2008).

Antes de avaliarmos a frequência das subpopulações de células Tregs e Th17, verificamos o percentual de células T totais e T CD4<sup>+</sup>, intestinais e esplênicas, com o intuito de verificar o impacto da administração do irinotecano e da ciclofosfamida sobre o número dessas células. A injeção diária de irinotecano por 4 dias consecutivos ocasionou a redução no percentual de linfócitos T e T CD4<sup>+</sup> intestinais, especialmente no quinto e sétimo dia após a primeira dose. Curiosamente, não reduziu o número dos linfócitos T e T CD4<sup>+</sup> esplênicos, sendo observado um aumento na frequência dessas células no quinto dia experimental, com queda a níveis basais no sétimo dia. A modulação das Tregs com ciclofosfamida aumentou consideravelmente os percentuais de células T totais e TCD4<sup>+</sup> intestinais e esplênicas nos animais com mucosite por irinotecano. Esses achados, se observados simultaneamente, sugerem uma associação inversa entre a frequência de células T e a frequência de células T regulatórias. De fato, no intestino dos animais com mucosite, há uma associação fortemente negativa entre as células T CD3<sup>+</sup> e as Tregs ( $r = -0,8322$ ;  $P = 0,0002$ , dados não mostrados). O mesmo é observado no baço ( $r=0,8431$ ;  $P=0,0002$ ; dados não mostrados). Nos animais que receberam irinotecano isoladamente, a queda de cerca de 50% no número de linfócitos T intestinais no quinto dia e de 90% no sétimo dia refletem o aumento expressivo na frequência de células Tregs nesse mesmo momento, cerca de 3x no quinto dia e de 7x no sétimo dia. No baço, o aumento de 1,4x no percentual de células CD3<sup>+</sup> e de 1,6 x no percentual de T CD4<sup>+</sup> no quinto dia pode ser decorrente da expansão clonal dessas células frente a antígenos que translocaram do lúmen intestinal para circulação sistêmica. Essa expansão é acompanhada pelo aumento homeostático de cerca de 2x na frequência de células Tregs no sétimo dia, quando o número de células T retorna aos níveis basais.

O aumento da frequência de células T com a administração de ciclofosfamida foi observado previamente por outros autores, corroborando com nossos achados. Lutsiak *et al.*, 2005, observou o aumento, a partir do 4<sup>a</sup> dia, no número de linfócitos T, CD4 e CD8, no baço e linonodos de camundongos C57BL/6 após dose única de 100mg/kg de ciclofosfamida. Esse aumento é atribuído à depleção seletiva das células Tregs, o que permite a expansão de outras subpopulações de células T. Radojic *et al.*, 2010,

contrariamente ao nosso estudo, verificaram o aumento apenas na frequência de células T CD8<sup>+</sup> após administração de ciclofosfamida em baixa dose, não sendo observadas diferenças com relação a frequência de células T CD4<sup>+</sup> ou células T totais. Entretanto, nesse estudo, foram utilizados camundongos BALB/c, a dose de 200 mg/kg de ciclofosfamida e a frequência das células foi avaliada apenas a nível hepático.

As células Tregs têm sido descritas como supressoras da resposta imune contra uma variedade de estímulos, incluindo bactérias comensais, auto antígenos e antígenos alimentares (KANAMORI *et al.*, 2016). São frequentemente encontradas na mucosa intestinal, especialmente na lâmina própria, onde controlam a resposta excessiva de células T efetora e de células do sistema imune inato, mantendo a homeostasia intestinal (PABST, 2013; OMENETTI *et al.*, 2015). Nós demonstramos que elevada frequência de Tregs é encontrada na lâmina própria do intestino delgado dos animais com mucosite induzida por irinotecano, especialmente no sétimo dia experimental. Vários autores também observaram o aumento no percentual de Tregs nas doenças inflamatórias intestinais (REIKVAM *et al.*, 2011; LORD *et al.*, 2015; SZNURKOWSKA *et al.*, 2016). Hólmen *et al.*, 2006, mostraram que pacientes com colite ulcerativa apresentam elevada frequência de Tregs no cólon quando comparados a controles saudáveis e que essas células foram altamente supressivas *in vitro*. Além disso, neste mesmo estudo, a frequência de Tregs aumentou no intestino inflamado com a atividade da doença, sugerindo que outras células efetoras estariam elevadas em frequência e promovendo o dano. Em pacientes com doença de Chron a comarcação para CD25, FOXP3 e CTLA4 no íleo aponta para o elevado número de Tregs em adultos e crianças doentes quando comparados a controles saudáveis (REIKVAM *et al.*, 2011). Boschetti *et al.*, 2017, encontraram achados semelhantes em um modelo murino de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) utilizando camundongos C57BL/6. Os autores observaram que a inflamação intestinal cursa com aumento no número de Tregs colônicas e que este aumento é resultante da proliferação de células Tregs da lâmina própria, mais do que pela diferenciação de novas Tregs a partir de percussores CD4<sup>+</sup>. Contrariamente, também em modelos murinos de colite induzida por DSS e ácido trinitrobenzenicosulfônico (TNBS) a frequência de células Tregs esteve reduzida no intestino dos animais e esta redução foi correlacionada com a gravidade da doença (KANG *et al.*, 2015; ZOU *et al.*, 2015).

Fang *et al.*, 2016, foram os únicos autores até o presente momento a avaliarem a frequência de células CD45<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> na lâmina própria intestinal e baço de

camundongos C57BL/6 após 8 dias de administração diária e única de irinotecano (50 mg/kg). Nenhuma alteração na frequência dessas células foi observada no oitavo dia em comparação com grupo controle. Entretanto, os autores não utilizaram o marcador CD25 para identificação das Tregs. Nós mostramos que quando se compara a frequência de células Tregs FOXP3<sup>+</sup>, sem diferenciar as populações CD25<sup>-</sup> e CD25<sup>+</sup>, de fato não há diferença significativa entre o grupo irinotecano e o controle. Entretanto, quando a população CD25<sup>+</sup> é avaliada um aumento expressivo do seu número é observado nos animais que receberam irinotecano. Além disso, os autores utilizaram um modelo diferente para indução da mucosite, com a prolongação dos dias e a redução da dose, não sendo observada diarreia nesses animais, ao contrário do nosso estudo. Acreditamos que o aumento na frequência de Tregs CD25<sup>+</sup> visto por nós seja um mecanismo compensatório ao dano e inflamação tecidual resultante da injeção de irinotecano.

O aumento no percentual de Tregs nos animais com mucosite por irinotecano ocorreu também a nível sistêmico, embora de forma mais discreta, como demonstrado em amostras de baço. Em pacientes com IBD, o aumento na frequência de células Tregs não é observado sistemicamente, ocorrendo, contrariamente, uma redução nos percentuais dessas células no sangue periférico (MAUL *et al.*, 2005). De acordo com Lord *et al.*, 2015, a queda recíproca no número de Tregs circulantes nos pacientes com IBD sintomática reflete o sequestro dessas células para o local da inflamação. Entretanto, a mucosite intestinal induzida por irinotecano cursa com significativa bacteremia (WONG *et al.*, 2015), o que justificaria a expansão de Tregs a nível sistêmico. Além disso, acreditamos que as células Tregs intestinais observadas no nosso modelo são ativadas no próprio intestino, mais do que oriundas do recrutamento a partir da periferia. Isto pode ser sugerido diante do fato de que os animais injetados apenas com salina apresentaram elevada frequência de células Tregs FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> e que após o desafio com irinotecano essas células regularam positivamente a expressão de CD25, como evidenciado pelo aumento na média de intensidade de fluorescência para esse marcador. De acordo com Zelenay *et al.*, 2005, células T CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> constituem um reservatório de células T regulatórias “inativas” que aumentam a expressão de CD25 após alterações na homeostasia tecidual. O estudo evidenciou que a expressão de CD25 ocorre também como uma assinatura da ativação das Tregs, não apenas das células T efetoras. Adicionalmente, Coleman *et al.*, 2011, demonstraram que na lâmina própria intestinal de camundongos saudáveis as células Tregs

encontradas em maior frequência são as CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>, corroborando com o observado no nosso estudo.

Simultaneamente ao aumento da frequência de células Tregs nós observamos o aumento do percentual de células Th17, no intestino e no baço. As células Th17 estão envolvidas na patogênese de doenças inflamatórias do trato gastrointestinal em humanos, como doença de Crohn e colite ulcerativa (GÁLVEZ, 2014; UENO *et al.*, 2015), e em modelos de colite murinos (LEPPKES *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2012; LIM *et al.*, 2016). Essas células produzem citocinas, tais como IL17A e IL-17F, as quais induzem a expressão de mediadores inflamatórios e o recrutamento de neutrófilos ao foco da inflamação por mecanismos diretos e indiretos (PELLETIER *et al.*, 2010). Oh *et al.*, 2014, também encontraram elevada frequência de células Th17 na lâmina própria de animais com colite induzida por TNBS ou DSS (OH *et al.*, 2014). Em pacientes com IBD a frequência de células Th17 sistêmicas e intestinais também se mostrou elevada no estudo realizado por Eastaff-Leung *et al.*, 2009.

Com intuito de avaliar o papel das células Tregs na patogênese da mucosite intestinal, uma baixa dose de ciclofosfamida foi administrada antes da primeira injeção de irinotecano. Lutsiak *et al.*, 2005, demonstraram que ciclofosfamida na dose de 100mg/kg induz apoptose seletiva das células T regulatórias e reduz a sua proliferação. Vários mecanismos são propostos para seletividade de ação de baixas doses de ciclofosfamida sobre as Tregs. As células Tregs possuem um comprometimento na capacidade de detoxificar metabólitos da ciclofosfamida. Elas expressam altos níveis de CD39, uma ectoenzima que hidroliza o ATP extracelular a ADP, causando efluxo do ATP intracelular. Baixos níveis de ATP reduz a concentração do agente anti-oxidante glutathiona e a capacidade das Tregs detoxificarem metabólitos. Além disso, as células Tregs não possuem o transportador ABC do tipo B1, o qual extrui drogas e metabólitos das células (ABU EID *et al.*, 2016). No presente estudo, nós observamos uma significativa redução na frequência das Tregs intestinais e esplênicas no sétimo dia após administração da ciclofosfamida. Adicionalmente, a modulação com ciclofosfamida reduziu também a expressão de FOXP3 nas células Tregs, o que reflete o status funcional dessas células. A média de intensidade de fluorescência para o FOXP3 foi relacionada por outros autores com a capacidade supressiva dessas células (Chauhan *et al.*, 2010). Esse achado corrobora com o observado por Zhao *et al.*, 2010, o qual demonstrou que a ciclofosfamida em baixas doses é capaz de reduzir não apenas o número das Tregs mas também sua função supressora.



No nosso estudo, a injeção de ciclofosfamida isoladamente não alterou a contagem de leucócitos sanguíneos, a integridade intestinal e o ganho de peso dos animais, sugerindo a ausência de efeitos tóxicos sistêmicos em baixa dose. Considerando que a ciclofosfamida em doses mais elevadas possui como importante efeito colateral a cistite hemorrágica, nós avaliamos a bexiga dos animais que receberam esse fármaco e não foram visualizadas alterações macroscópicas (dados não mostrados). De fato, a ciclofosfamida só induz hemorragia na bexiga de camundongos C57BL/6 a partir da dose de 300 mg/kg, e apenas em doses maiores a esta induz as demais alterações observadas na cistite, como aumento da permeabilidade vascular e edema (FRAISER; KEHRER, 1992). Interessantemente, animais injetados com irinotecano e depletados de Tregs desenvolveram mucosite intestinal mais grave, como detectado pelo aumento da inflamação intestinal, perda de peso, diarreia intensa já no quinto dia experimental e 100% de mortalidade. Corroborando com esses achados, o papel protetor das tregs em outros modelos animais de inflamação intestinal foi previamente demonstrado. Em meados de 1995, Sakaguchi *et al.*, publicaram o primeiro trabalho em que a depleção de células  $CD4^+CD25^+$  esteve associada a inflamação gastrointestinal, além de manifestações auto-imunes, antes mesmo dessas células serem denominadas de Tregs. Posteriormente, em um modelo de colite induzida por DSS, a depleção de Tregs com anticorpo anti-CD25 também induziu dano intestinal mais grave (WANG *et al.*, 2015). Em camundongos expressando FOXP3 ligado ao receptor da toxina diftérica a injeção da toxina diftérica ocasionou depleção de células Tregs e exacerbou a colite induzida por DSS (BOEHM *et al.*, 2012). Adicionalmente, a transferência adotiva de Tregs foi capaz de prevenir o desenvolvimento (Liu *et al.*, 2003; Mottet *et al.*, 2003) e de curar a colite já estabelecida em modelos murinos (IZCUE *et al.*, 2006).

Os neutrófilos desempenham um papel importante na manutenção da homeostasia intestinal. Eles possuem mecanismos de defesa cruciais para eliminação de micro-organismos que translocaram do lúmen para a lâmina própria através da camada de células epiteliais intestinais. Em condições normais, essas células possuem um papel benéfico, entretanto, a estimulação excessiva dos neutrófilos que ocorre nas doenças inflamatórias intestinais, por exemplo, está associado ao dano na mucosa e sintomas debilitantes da doença (FOUNIER; PARKOS, 2012). O número de neutrófilos intestinais, evidenciado pela atividade da enzima mieloperoxidase, encontrou-se aumentado no nosso estudo nos animais com mucosite por irinotecano no quinto dia experimental, decaindo no

sétimo dia. Elevado número de neutrófilos no intestino dos animais com mucosite por irinotecano também foi observado em estudos anteriores de outros autores, corroborando com nossos dados (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014, WONG *et al.*, 2015). Tendo em vista que as células Th17 podem estar envolvidas no recrutamento de neutrófilos ao sítio inflamatório nós realizamos uma análise de correlação entre a frequência dessas duas células. Não observamos, entretanto, correlação entre elas nos animais com mucosite intestinal. Além disso, quando os animais foram injetados com ciclofosfamida o número de neutrófilos intestinais no sétimo dia aumentou, apesar do percentual de célula Th17 ter sido parcialmente reduzido. Este fato sugere que o recrutamento dos neutrófilos para o intestino ocorre de forma independente da ação das células Th17 no nosso modelo. De fato, os neutrófilos podem ser recrutados da circulação sistêmica ao intestino por meio de quimiocinas derivadas de células da resposta imune inata, como macrófagos residentes na lâmina própria, e de outras células da resposta imune adaptativa (FOURNIER; PAKOS, 2012).

Paralelamente a isto, observamos que o número de neutrófilos decai no sétimo dia experimental, justamente no momento em que há o maior pico na frequência de células Tregs intestinais. De fato, houve uma correlação negativa entre o número dessas células, sugerindo que a ativação das Tregs pode limitar o acúmulo de neutrófilos na lâmina própria intestinal. Essa hipótese é confirmada pelo achado de que a depleção de células Tregs com ciclofosfamida aumenta consideravelmente o número de neutrófilos no intestino dos animais com mucosite. Atkinson *et al.* 2016, também observou intenso infiltrado neutrofílico em camundongos depletados de Tregs em um modelo de artrite. Bohem *et al.*, 2012, observou que a depleção de Tregs em um modelo de colite induzida por DSS também induziu ao aumento do infiltrado celular no cólon. As células Tregs podem de fato limitar o infiltrado tecidual de neutrófilos por meio da modulação negativa na produção de quimiocinas, como KC, e da indução direta de apoptose nessas células (LEWKOWICZ *et al.*, 2006). De fato, quando modulamos a frequência de células Tregs com ciclofosfamida os níveis da quimiocina KC, envolvida na migração de neutrófilos, aumentou significativamente ao mesmo tempo em que o influxo de neutrófilos para o intestino foi potencializado.

Ao passo que o aumento da frequência das Tregs teria papel benéfico sobre a mucosite intestinal por limitar o dano intestinal mediado por neutrófilos, por exemplo, poderia contribuir para o estado sepsis-like presente nos animais com mucosite por

irinotecano, descrito por Wong *et al.*, 2013. A autora observou que os animais com mucosite apresentaram uma redução da temperatura retal no quinto e sétimo dia após a administração do irinotecano, um achado característico de sepse. Arelado a isto, os animais apresentaram aumento do número de neutrófilos no pulmão no sétimo dia experimental, quando a bacteremia foi de 42,85%. Sabe-se que a sepse severa cursa com disfunção na migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, muito em parte em decorrência da redução na expressão de CXCR2 nos neutrófilos circulantes, um receptor para quimiocina IL-8 nos humanos e KC nos camundongos (RIO-SANTOS *et al.*, 2007). Adicionalmente, o aumento da expressão de CCR2 nessas células, receptor para CCL2 (MCP-1), é observado, o que resulta em sua migração para órgãos distantes como o pulmão (SOUTO *et al.*, 2011; SÔNEGO; ALVES-FILHO; CUNHA, 2014). Teixeira, 2015, em dados não publicados, demonstrou que os neutrófilos de camundongos C57BL/6 com mucosite intestinal induzida por irinotecano apresentam uma redução na expressão de CXCR2 e o aumento de CCR2 em sua superfície, o que corrobora com os achados de Rio-Santos *et al.*, 2007 e Souto *et al.*, 2011, respectivamente, no modelo de sepse polimicrobiana severa, e com o observado por Wong (2015) na mucosite. Adicionalmente, a sepse severa polimicrobiana murina cursa com aumento da frequência de células Tregs (TATURA *et al.*, 2015). Essas células são supressivas e inibem a migração de neutrófilos *in vitro* (MOLINARO *et al.*, 2015). Curiosamente, quando a sepse polimicrobiana é induzida em camundongos DREG, depletados de Tregs FOXP3<sup>+</sup>, os animais apresentam maior mortalidade e escores de sepse em sua fase inicial (até o sétimo dia), quando comparados aos não depletados (TATURA *et al.*, 2015). Esses achados sugerem o papel dual das células Tregs nesse modelo, sendo importante para limitar o estado hiperinflamatório inicial que resulta em maior dano, ao mesmo tempo em que pode contribuir para hipo-responsividade inata e adaptativa e menor responsividade a patógenos em um estado posterior.

Além da identificação da frequência das células Tregs e Th17 intestinais e esplênicas, nós realizamos a análise da razão entre % Tregs/% Th17, tendo em vista que essa medida permite avaliar com mais afinco o balanço entre essas subpopulações de células T. No intestino, ocorreu o aumento dessa razão no sétimo dia após a injeção de irinotecano, sugerindo que o número das células Tregs sofre um aumento consideravelmente maior do que o das células Th17. Interessantemente, esse parâmetro correlacionou-se positivamente com os escores de diarreia e histopatológico dos animais, podendo ser um indicativo de

gravidade da mucosite. Contrariamente, houve uma redução da razão %Treg/%Th17 a nível sistêmico no sétimo dia experimental, a qual foi correlacionada negativamente com os escores de diarreia e histopatológicos. Isto sugere que quanto maior a frequência de células Th17 sistêmicas em detrimento do percentual das Tregs, pior o prognóstico dos animais. O aumento de células Th17 sistêmicas foi observado em animais com translocação bacteriana do trato gastrointestinal para circulação sistêmica (KLATT *et al.*, 2010). Diante do fato de que achados prévios do nosso laboratório mostram que os animais com mucosite por irinotecano apresentam translocação bacteriana para o sangue periférico (WONG *et al.*, 2015), podemos sugerir que o aumento no número de células Th17 sistêmicas, associado ao maior escore de diarreia e histopatológico, é decorrente de maior bacteremia.

Alterações na razão entre %Tregs/Th17 foram observadas em outras patologias e sugeridas como marcador de melhor ou pior prognóstico. Na rejeição aguda ao transplante de fígado a redução da razão no sangue periférico dos pacientes esteve relacionada ao dano hepático e maior índice de rejeição (WANG *et al.*, 2014). Em pacientes com HIV, a redução da razão Treg/Th17 foi relacionada com menor carga viral e melhor evolução da doença (FALIVENE *et al.*, 2015). Pacientes com IBD apresentam redução na taxa Treg/Th17 no sangue periférico (EASTAFF-LEUNG *et al.*, 2010). A investigação da relação entre alterações nas taxas de células Treg/Th17 e a gravidade da mucosite nos pacientes em quimioterapia a base de irinotecano seria de grande valia na busca de marcadores de prognóstico ou de detecção precoce, especialmente se essa investigação for realizada no sangue periférico, devido à facilidade da coleta e menor custo.

Adicionalmente ao aumento da frequência de células Tregs e Th17, bem como às alterações na razão %Tregs/Th17, nós observamos uma redução na frequência de células linfoides imunes inatas do tipo 3 (ILC3), fenótipos CCR6<sup>+</sup> e CCR6<sup>-</sup>, no intestino dos animais ao longo do desenvolvimento da mucosite. Células ILC3 são descritas como análogas às células Th17, dependentes de ROR- $\gamma$ t para diferenciação e produtoras de IL-17A, IL17-F e IL-22. Possuem ação anti-inflamatória e protetora sobre células epiteliais intestinais, estando envolvidas no reparo tecidual, proliferação epitelial e homeostasia (WOJNO; ARTIS *et al.*, 2012). Nos camundongos, são células heterogêneas e podem ser distinguidas com base na expressão do receptor de quimiocina CCR6. As células ILC3 CCR6<sup>+</sup> são caracterizadas pela produção das citocinas IL17A, IL-22 e GM-CSF, enquanto que as células ILC3 CCR6<sup>-</sup> produzem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-22 e GM-CSF (ARTIS; SPITS, 2015). O decréscimo no número de ILC3 foi observado no intestino de pacientes com

doença de Crohn (TAKAYAMA *et al.*, 2010; BERNINK *et al.*, 2013). Em modelos murinos de inflamação intestinal, o efeito protetor das células ILC3 foi demonstrado em vários estudos (SATO-TAKAYAMA *et al.*, 2008; SONNENBERG *et al.*, 2011; MIELKE *et al.*, 2013). Na colite induzida por DSS a produção de IL-22 por células ILC3 atenuou a inflamação colônica (MIELKE *et al.*, 2013). Entretanto, contrariamente, outros estudos mostraram o papel patogênico dessas células, as quais contribuem para inflamação tecidual em pacientes com colite ulcerativa, doença de Crohn (LONGMAN *et al.*, 2014) e em modelos murinos de colite (EKEN *et al.*, 2014). Esses achados discrepantes podem ser decorrentes da heterogeneidade e plasticidade dentro do grupo ILC3, da não diferenciação nas subpopulações  $CCR6^-$  ou  $CCR6^+$ , das diferentes estratégias de gate utilizadas, bem como a diversidade dos modelos animais e linhagens.

Verificamos que a depleção de células Tregs com ciclofosfamida ocasiona a manutenção das células ILC3  $CCR6^-$  dos animais com mucosite intestinal em níveis semelhantes ao do controle, havendo uma tendência de aumento da frequência das células ILC3  $CCR6^+$ . Células ILC3 são dependentes de IL-2 para sua proliferação e manutenção competindo com as células T pelo consumo dessa citocina, (BURG *et al.*, 2015). As células Tregs intestinais observadas em nosso estudo nos animais com mucosite expressam altos níveis de CD25 (receptor para IL-2) e poderiam suprimir a expansão das células ILC3 pelo consumo de IL-2. Este é um dos mecanismos pelo qual as Tregs realizam a supressão de células T efetoras, por exemplo (CHENG *et al.*, 2011). Corroborando com essa hipótese, encontramos uma correlação negativa entre a frequência das células ILC3 e o percentual de células Tregs nos animais injetados com irinotecano.

Além da análise da frequência de diferentes subpopulações celulares, avaliamos os níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , KC e IL-10 por ELISA e a expressão de TNF- $\alpha$  e do mRNA para IL-17A no intestino dos animais no sétimo dia experimental. IL-1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  são citocinas pró-inflamatórias envolvidas na ativação de macrófagos, estimulação da secreção de citocinas por células do sistema imune inato e adaptativo e produção de metabólitos do ácido araquidônico por vários tipos celulares, incluindo as células epiteliais intestinais (SARTOR, 1994). KC é uma importante citocina quimioatraente de neutrófilos, análoga a IL-8 humana (FILLIPO *et al.*, 2008). Níveis elevados de KC, IL-1- $\beta$  e/ou TNF- $\alpha$  visto por nós na mucosite intestinal induzida por irinotecano já foi observado previamente por outros autores (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2015; ARIFA *et al.*, 2014). Essas citocinas contribuem para gravidade e dano tecidual na mucosite

(WILLIAMS, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2016). O aumento de KC encontrado por nós corrobora com a migração de neutrófilos para o intestino dos animais com mucosite. Apesar de termos observados um decréscimo no número de neutrófilos no sétimo dia após a primeira dose de irinotecano quando comparado ao quinto dia, o número de neutrófilos no sétimo dia ainda é elevado (cerca de 6x) em comparação aos animais injetados com salina ( $P=0,0101$ ; Teste t de Student). Além disso, não realizamos a dosagem de KC no quinto dia experimental, quando o número de neutrófilos tem seu pico. Provavelmente, neste momento, os níveis dessa citocina seria ainda mais elevado. A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória, liberada por células Th17, ICL3, células NK e NKT, e envolvida no recrutamento de vários tipos celulares ao foco inflamatório. Sua ação sobre a matriz extracelular induz a produção de metaloproteinases, o que facilita a transmigração de leucócitos (KOENDERS *et al.*, 2005). Além disso, estimula a produção de COX-2 e PGE2, potencializando o recrutamento celular por meio da vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SHALOM-BARAK *et al.*, 1998). Adicionalmente, pode suprimir o desenvolvimento da resposta Th2 no cólon e estimular o padrão Th1, aumentando a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  (ANDOH *et al.*, 2002; VELDHOEN *et al.*, 2017). Essas citocinas atuam como uma alça contra-regulatória positiva aumentando ainda mais a síntese de IL-17. No presente estudo, a mucosite intestinal induzida por irinotecano cursou com o aumento da produção de IL17A, corroborando com os maiores níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  observados.

A depleção das Tregs com ciclofosfamida ocasionou o aumento das citocinas pró-inflamatórias KC e TNF- $\alpha$ , bem como a redução dos níveis de IL-10. A IL-10 possui ação anti-inflamatória, podendo inibir a produção de citocinas Th1, como TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ . Não observamos diferença na produção de IL-10 intestinal entre o grupo que recebeu apenas irinotecano e o salina, apesar de haver uma tendência à redução nos animais com mucosite. No intestino, as Tregs CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> são a principal fonte de IL-10, utilizando-a como mecanismo de supressão (COLEMAN *et al.*, 2011). Considerando que houve uma redução na frequência de células Tregs CD25<sup>-</sup> 7 dias após a administração do irinotecano é razoável não ter ocorrido o aumento na síntese de IL-10 nesses animais. Além disso, Fang *et al.*, 2016, observaram uma redução da frequência de células CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-10 na lâmina própria de camundongos oito dias após a injeção diária de irinotecano, corroborando com esses achados. No nosso estudo, após a injeção de ciclofosfamida os

níveis de IL-10 são reduzidos, tendo em vista que esse fármaco depleta tanto as Tregs CD25<sup>+</sup> como as CD25<sup>-</sup>.

A expressão relativa de IL-17A foi reduzida pela metade após a depleção das Tregs, embora não tenha sido estatisticamente significativa, provavelmente devido ao desvio padrão elevado dos animais do grupo irinotecano. Essa redução parcial da IL17A corrobora com o percentual reduzido das células Th17 nos animais depletados de Treg. O decréscimo na síntese de IL-10, bem como o aumento das citocinas pró-inflamatórias KC e TNF- $\alpha$ , condiz com o maior dano e inflamação intestinal observado nos animais com mucosite que receberam a ciclofosfamida. Matar *et al.*, 2012, também observaram alterações na produção de citocinas após a administração de baixa dose de ciclofosfamida em ratos com linfoma. Nesse estudo, houve o decréscimo nos níveis de IL-10 e o aumento na produção de IFN- $\gamma$  a nível sistêmico, ocorrendo a mudança do perfil Th2 para Th1 com a administração da ciclofosfamida.

Curiosamente, a depleção das Tregs com ciclofosfamida cursou com redução simultânea parcial na frequência das células Th17. A nossa hipótese inicial era de que a depleção das células Tregs ocasionaria o aumento da frequência das células Th17 intestinais, considerando que as Tregs podem modular negativamente a resposta mediada por células Th17 em outros modelos de inflamação (OGINO *et al.*, 2011; OMENETTI; PIZARRO, 2015). Entretanto, de forma contrária a esses estudos, observamos uma correlação positiva entre a frequência de células Tregs e Th17 intestinais nos animais com mucosite. Chen *et al.*, 2011, mostraram que as Tregs são importantes para manutenção do repertório de células Th17. Nesse estudo, as células Tregs ativadas, expressando altos níveis de CD25, promoveram *in vivo* a diferenciação das células Th17 de forma independente de TGF- $\beta$ , por meio do consumo de IL-2. De fato, Laurence *et al.*, 2007, demonstraram que a IL-2 inibe a polarização de linfócitos para o perfil Th17. No nosso estudo, as células Tregs dos animais com mucosite regulam positivamente a expressão de CD25. O aumento na frequência de células Th17 observado no nosso modelo pode ser decorrente, pelo menos em parte, do consumo de IL-2 pelas células Tregs. Esse fato justificaria o decréscimo parcial na frequência de células Th17 com injeção de ciclofosfamida.

Apesar dos nossos resultados sugerirem que as células Th17 não estão envolvidas no agravamento da mucosite, o papel das células Th17 no dano intestinal mediado

pelo irinotecano não pode ser inferido com os dados do presente estudo. A inibição da proliferação das células Th17, com fármacos como a digoxina e seus derivados que atuam como agonistas do receptor ROR- $\gamma$ t (HUH *et al.*, 2011), seria uma ferramenta válida para avaliar o envolvimento dessas células no nosso modelo.

Questionamos se outras subpopulações de células TCD4<sup>+</sup>, não-reg e não-Th17 estariam alteradas no intestino dos animais no nosso modelo, já que citocinas que contribuem para o padrão de reposta Th1, como TNF- $\alpha$ , encontram-se elevadas no intestino dos animais. Observamos uma redução discreta na frequência dessas células no sétimo dia após a primeira dose de irinotecano, o que pode ser decorrente da elevação simultânea na frequência de Tregs intestinais. Corroborando com essa hipótese houve uma correlação negativa entre as células Tregs e as outras subpopulações de células T nos animais com mucosite. Adicionalmente, a depleção das Tregs com ciclofosfamida ocasionou o aumento do percentual das células T não-reg e não Th17. Além disso, houve uma correlação positiva entre as células T não-reg e não Th17 e o número de neutrófilos intestinais, sugerindo que, além de células do sistema imune inato, outras células TCD4<sup>+</sup> podem estar envolvidas no recrutamento dos neutrófilos para o foco inflamatório. Entretanto, nossos resultados não permitem afirmar que outras subpopulações de célula T estão envolvidas na patogênese da mucosite e nem quais seriam essas células. Achados prévios do nosso grupo apontam para o importante papel da IL-18 no desenvolvimento da mucosite por irinotecano (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014). Esta citocina está envolvida na diferenciação de células Th1 ou Th2, a depender da presença de IL-12. O aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e KC observado com a depleção das Tregs, somado ao aumento do número das células T não-reg, sugere o envolvimento de células Th1 no nosso modelo. Não podemos desconsiderar, entretanto, que o aumento na produção dessas citocinas pode ser decorrente também do aumento da ativação de células residentes, como macrófagos.

É notório o papel das células Tregs no controle do dano intestinal induzido pelo irinotecano no nosso modelo, uma vez que a depleção dessas células foi deletéria aos animais com mucosite. Entretanto, o limite entre o seu papel anti-inflamatório benéfico e a indução de imunossupressão que contribui para o estado seps-like não está claro. A indução da proliferação das células Tregs, com uso de um agonista anti-CD28 (D665-200 $\mu$ g/mice) por exemplo (GUILLIAMS *et al.*, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2015), seria uma ferramenta útil para avaliar o impacto do aumento do número dessas células sobre a mucosite, o estado seps-



like e a sobrevida dos animais. Infelizmente, devido ao custo oneroso do agonista anti-CD28 não foi possível a realização desse experimento no presente estudo.

Vale salientar, que um dos fatores limitantes do nosso estudo é o fato de termos avaliado as alterações na resposta imune inata e adaptativa dos animais com mucosite na ausência do tumor. Sabe-se que o microambiente tumoral pode modular a resposta imune local e sistêmica em prol de um estado de imunossupressivo, com elevação da frequência de células Tregs e inibição dos mecanismos efetores da resposta imune inata e adaptativa (ELKORD *et al.*, 2010). Diante disto, é razoável hipotetizar que, na presença do tumor, a frequência de células Tregs dos animais com mucosite fosse ainda mais elevada do que a observada no presente estudo. Este fato poderia contribuir para o desenvolvimento de uma mucosite mais branda. Ao mesmo tempo, poderia aumentar o estado seps-like, com maior translocação bacteriana e bacteremia dos animais. O impacto da presença do tumor sobre a sobrevida e a frequências das células Tregs nos animais com mucosite deve ser avaliado em estudo futuro.

Ensaio clínicos utilizando ciclofosfamida em baixas doses, também chamada de quimioterapia metronômica, associada a outros agentes, vêm sendo realizados em pacientes com diferentes tipos de tumores avançados, como mama, osteossarcoma, melanoma, ovariano e colorretal (LERSCH *et al.*, 1992; COLLEONI *et al.*, 2006; GARCIA *et al.*, 2008; PENEL; ADENIS, BOCCI, 2010; COLLEONI *et al.*, 2016; PERROUD *et al.*, 2016). As vantagens do uso da ciclofosfamida em baixas doses seria a modulação sobre a resposta imune, além de uma ação anti-angiogênica, o que juntas propiciam a redução do crescimento tumoral. Além disso, apresenta-se de forma mais bem tolerável do que em doses mais elevadas. Entretanto, como evidenciado no nosso estudo, a utilização de baixas doses de ciclofosfamida agrava a mucosite intestinal ocasionada pelo irinotecano. Diante disto, estudos avaliando a relação entre o uso de baixas dose de ciclofosfamida e a incidência da mucosite intestinal é relevante. Não identificamos nenhum estudo que tenha avaliado o impacto da incorporação de baixas doses de ciclofosfamida ao irinotecano no tratamento do câncer colorretal ou outros tumores em humanos ou murinos. Nossos achados, se extrapolados para clínica, permitem uma reflexão acerca do momento ideal para introdução da ciclofosfamida em baixa dose em outros estudos, uma vez que os pacientes em quimioterapia desenvolvem mucosite especialmente após o primeiro ciclo de quimioterapia. Além disso, é importante pensar se a associação desse fármaco com os protocolos que incluem irinotecano é válida.

## 8. CONCLUSÕES

É inútil falar de curas ou pensar em remédios até termos considerado as causas [...] as curas podem ser imperfeitas e não servir para nada enquanto as causas não tiverem sido pesquisadas (Robert Burton, 1893).

- ✓ As células T regulatórias são importantes para o controle do dano intestinal mediado pelo irinotecano, por meio da modulação negativa sobre células do sistema imune inato, como neutrófilos e células linfoides inatas do tipo 3, e sobre células do sistema imune adaptativo.
- ✓ A razão do % Treg/Th17 intestinal e esplênica apresentou-se como um marcador de gravidade da mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano.
- ✓ A expansão de células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, Tregs e Th17, ocorre a nível sistêmico ao longo do desenvolvimento da mucosite intestinal, o que indica a presença de ativação imune sistêmica nesses animais.
- ✓ O aumento na frequência de células Th17 intestinais visto nos animais com mucosite é em parte dependente da presença das células Tregs, uma vez que a depleção destas células com ciclofosfamida reduziu parcialmente a frequência das células Th17.

## 9. PESPECTIVAS

O composto curativo não tóxico ainda está para ser descoberto, mas já sonhamos com ele  
(James F.Holland)

- ✓ Inibir seletivamente a diferenciação de células Th17 com digoxina a fim de avaliar o papel dessas células no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano.
- ✓ Induzir o aumento da frequência de células Tregs com agonista anti-CD28 e avaliar o impacto disto no desenvolvimento da mucosite.
- ✓ Quantificar as células Th1 e Th2 intestinais e esplênicas nos animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano, injetados ou não com ciclofosfamida.
- ✓ Avaliar se os achados observados no presente estudo são reproduzidos na presença do tumor nos animais.
- ✓ Quantificar as células Tregs e Th17 no sangue periférico dos pacientes com câncer colorretal metastático, antes e após os ciclos de quimioterapia a base de irinotecano. Verificar se existe relação entre as alterações na frequência dessas células e o desenvolvimento e gravidade da mucosite intestinal nesses pacientes. Avaliar se a taxa Treg/Th17 sistêmica possui relação com a evolução da mucosite.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory Bowel Disease. **The new England Journal of Medicine**, v. 361, p. 2066-2078, 2009.
- ABU EID, R.; RAZAVI, G.S. R.; MKRTICHYAN, M.; *et al.* Old-School Chemotherapy in Immunotherapeutic Combination in Cancer, A Low-cost Drug Repurposed. **Cancer Immunology Research**, v. 4, p. 377-382, 2016.
- AHERN, P. P. Interleukin 23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. **Immunity**, v. 33, p. 279-288, 2010.
- ALVES- FILHO, J. C.; FREITAS, A.; SOUTO, F.O.; *et al.* Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophils migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.106, p. 4018-4023, 2009.
- ANDOH, A. IL-17 selectively down-regulates TNF- $\alpha$ -induced RANTES gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. **The Journal of Immunology**, v.169, p. 1683-1687, 2002.
- ANDREYEV, J.; ROSS P.; DONNELLAN, C. Lennan E, Leonard P, Waters C, *et al.* Guidance on the management of diarrhoea during cancer chemotherapy. **Lancet Oncology**, v.15, p. 447-460, 2014.
- ARTIS, D.; SPITS, H. The biology of innate lymphoid cells. **Nature**, v. 517, p. 293-301, 2015.
- ATKINSON, S.M.; HOFFMANN, U.; HAMANN, A.; *et al.* Depletion of regulatory T cells leads to an exacerbation of delayed-type hypersensitivity arthritis in C57BL/6 mice that can be counteracted by IL-17 blockade. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, p. 427-440, 2016.
- BACCHETTA, R.; PASSERINI, L.; GAMBINERI, E.; *et al.* Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1713-1722, 2006.
- BASTOS, R. W.; PEDROSO, S. H.; VIEIRA, A.; *et al.* T. *Saccharomyces cerevisiae* UFMG A-905 treatment reduces intestinal damage in a murine model of irinotecan-induced mucositis. **Beneficial Microbes**, v.7, p. 549-557, 2016.

- BECKER, C. Cutting edge: IL-23 crossregulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 2760-2764, 2006.
- BERNINK, J. H.; PETERS, C. P.; MUNNEKE, M. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. **Nature Immunology**, v. 14, p. 221-229, 2013.
- BETTELLI, E.; KORN, T.; OUKKA, M.; *et al.* Induction and effector functions of T(H)17 cells. **Nature**, v. 453, p. 1051–1057, 2008.
- BEVINS, C. L.; SALZMAN, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 356-368, 2011.
- BOEHM, F.; MARTIN, M.; KESSELRING, R.; *et al.* Deletion of Foxp3+ regulatory T cells in genetically targeted mice supports development of intestinal inflammation. **BMC Gastroenterology**, v. 12, p. 97, 2012.
- BOSCHETTI, G.; KANJARAWI, R.; BARDEL, E.; *et al.* Gut Inflammation in Mice Triggers Proliferation and Function of Mucosal Foxp3+ Regulatory T Cells but Impairs Their Conversion from CD4+ T Cells. **Journal of Crohns and Colitis**, v.11, p. 105-117, 2017.
- BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; *et al.* VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. **Cancer Biology Therapy**, v.6, p. 1449-54, 2007.
- BRANDTZAEG, P. Food allergy: separating the science from the mythology. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, p. 380-400, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do Câncer:** abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.
- BRODE, S.; COOKE, A. Immune-Potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. **Critical Reviews in Immunology**, v.28, p. 109-126, 2008.

CAMPBELL, J. M.; STEPHENSON, M. D.; BATEMAN, E.; *et al.* Irinotecan-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. **Pharmacogenomics Journal**, DOI: 10.1038/tpj.2016.58, 2016.

CARLOTTO, A.; HOGSETT, V. L.; MAIORINI, E. M. *et al.* The Economic Burden of Toxicities Associated with Cancer Treatment: Review of the Literature and Analysis of Nausea and Vomiting, Diarrhoea, Oral Mucositis and Fatigue. **Pharmaco Economics**, v. 31, p. 753-766, 2013.

CASSEL, S. L.; EISENBARTH, S. C.; IYER, S. S. *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.105, p.9035-9040, 2008.

CHAUHAN, S. K.; SABAN, D. R.; LEE, H. K.; *et al.* Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. **The Journal of Immunology**, v. 182, p.148-153, 2009.

CHEN, Y.; HAINES, C. J.; GUTCHER, I.; *et al.* Foxp3+ regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2. **Immunity**, v. 34, p. 409-421, 2011.

CHENG, G.; YU, A.; MALEK, T. R. T cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T regulatory cells. **Immunology Reviews**, v. 241, p.63-76, 2011.

COLLEONI, M.; SANNA, L. O G.; ROCCA, A. *et al.* Metronomic low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate plus or minus thalidomide in metastatic breast cancer: antitumor activity and biological effects. **Annals of Oncology**, v. 17, pages 232-238, 2006.

COLLEONI, M.; GRAY, K. P.; GELBER, S. Low-Dose Oral Cyclophosphamide and Methotrexate Maintenance for Hormone Receptor–Negative Early Breast Cancer: International Breast Cancer Study Group Trial 22-00. **Journal of Clinical Oncology**, doi.org/10.1200/JCO.2015.65.6595, 2016.

DE FILIPPO, K.; HENDERSON, R. B.; LASCHINGER, M.; *et al.* Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages Using Distinct TLR Signaling Pathways. **The Journal of Immunology**, v.180, p.4308-4315, 2008.

DIMELOE, S.; FRICK, C.; FISCHER, M. *et al.* Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. **European Journal of Immunology**, v. 44, p. 3614-3620, 2014.

DÍAZ, R.; APARICIO, J.; MOLINA, J. *et al.* Clinical Predictors of Severe Toxicity in Patients Treated with Combination Chemotherapy with Irinotecan and/or Oxaliplatin for Metastatic Colorectal Cancer. **Medical Oncology**, v. 23, p. 347-357, 2006.

DOUILLARD, J. Y.; CUNNINGHAM, D.; ROTH, A. D. *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **Lancet**, v. 355, p. 1041-1047

DUCHMANN, R. Peripheral and intestinal regulatory CD4<sup>+</sup> CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 128:1868-1878, 2005.

EASTAFF-LEUNG, N.; MABARRACK, N.; BARBOUR A.; *et al.* Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells, Th17 Effector Cells, and Cytokine Environment in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, p. 80-89, 2010.

ELKORD, E.; ALCANTAR-OROZCO, E. M.; DOVEDI, S. J. *et al.* T regulatory cells in cancer: recent advances and therapeutic potential. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.10, p.1573-1586, 2010.

EKEN, A.; SINGH, AK.; TREUTING, P. M.; *et al.* IL-23R<sup>+</sup> innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. **Mucosal Immunology**, v. 7, p.143-154, 2014.

FAKIH, M. G. Metastatic Colorectal Cancer: Current State and Future Directions. **Journal of Clinical Oncology**, v.33, 2015.

FALIVENE, J.; GHIGLIONE, Y.; LAUFER, N.; *et al.* Th17 and Th17/Treg ratio at early HIV infection associate with protective HIV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses and disease progression. **Scientific Reports**, DOI:10.1038/srep11511, 2015.

FANG, Z. Z.; ZHANG, D.; CAO, Y. F. *et al.* Irinotecan (CPT-11)-induced elevation of bile acids potentiates suppression of IL-10 expression. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 291, p. 21-27, 2015.

- FOURNIER, B. M.; PAKOS, C. A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. **Mucosal Immunology**, v. 5, p. 354-366, 2012.
- FRAISER, L.; KEHRER, J. P. Murine Strains differences in metabolism and bladder toxicity of cyclophosphamide. **Toxicology**, v. 75, p.257-272, 1992.
- FRANCHI, L.; MONTELEONE, I.; HAO, L-Y.; *et al.* Inhibiting Oxidative Phosphorylation In Vivo Restrains Th17 Effector Responses and Ameliorates Murine Colitis. **The Journal of Immunology**, v. 198, p. 2735-2746, 2017.
- FUSS, I. J. IL-17: intestinal protector or effector? **Nature**, v. 4, p. 366-367, 2011.
- GÁLVEZ, J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. **ISRN Inflammation**, DOI: 10.1155/2014/928461, 2014.
- GARCIA, A. A.; HIRTE, H.; FLEMING, G. *et al.* Phase II Clinical Trial of Bevacizumab and Low-Dose Metronomic Oral Cyclophosphamide in Recurrent Ovarian Cancer: A Trial of the California, Chicago, and Princess Margaret Hospital Phase II Consortia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, p. 76-82, 2008.
- GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Cancer chemotherapy-induced diarrhea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer**, v. 14, p. 890-900, 2006.
- GOTTLIEB, J. A.; GUARINO, A. M.; CALL, J. B. *et al.* Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). **Cancer Chemotherapy Reports**, v.54, p. 461-470, 1970.
- GRABENBAUER, G. G.; HOLGER, G. Management of radiation and chemotherapy related acute toxicity in gastrointestinal cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 30, p. 655-664, 2016.
- GUABIRABA, R.; BESNARD, A.G.; MENEZES, G. B.; *et al.* IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunology**, v. 7, p. 1079-1093, 2014.
- GUPTA, E.; LESTINGI, T. M.; MICK, R. *et al.* Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. **Cancer Research**, v. 54, p. 3723-3725, 1994.



HAGGAR, F. A.; BOUSHEY, R. P. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. **Clinical Colon Rectal Surgery**, v. 22, p. 191-197, 2009.

HARDMAN, W.E.; MOYER, M.P.; CAMERON, I. L. Consumption of an omega-3 fatty acids product, INCELL AAFA™, reduced side-effects of CPT-11 (irinotecan) in mice. **British Journal of Cancer**, v.86, p.983-988, 2002.

HARTOG, A.; BELLE, F. N.; BASTIAANS, J.; *et al.* A potential role for regulatory T-cells in the amelioration of DSS induced colitis by dietary non-digestible polysaccharides. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 227-33, 2015.

HE, Y.; LIN, L. J.; ZHENG, C. Q.; *et al.* Cytokine expression and the role of Th17 cells in a mouse model of colitis. **Molecular Medicine Reports**, v. 6, p. 1438-1442, 2012.

HEYMANN, D.; BAUER, M.; BECKER, H.; *et al.* Human CD4+CD25+ regulatory T cells are sensitive to low dose cyclophosphamide: implications for the immune response. **Plos One**, doi: 10.1371/journal.pone.0083384, 2013.

HOLMÉN, N.; LUNDGREN, A.; LUNDIN, S.; *et al.* Functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. **Inflammatory Bowel Diseases**, DOI: 10.1097/00054725-200606000-00003, 2006.

HSIANG, Y. H.; LIU, L. F. Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. **Cancer Research**, v. 48, p. 1722-1726, 1988.

HSIANG, Y-H.; HERTZBERG, R.; HECHT, S. *et al.* Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 14873-14878, 1985.

HSU, H. Y.; KUAN, Y. C.; LIN, T. Y.; *et al.* Reishi Protein LZ-8 Induces FOXP3 (+) Treg Expansion via a CD45-Dependent Signaling Pathway and Alleviates Acute

Intestinal Inflammation in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternatervative Medicine**. DOI: 10.1155/2013/513542, 2013.

HUEBER, W. Inhibition of IL-17A by secukinumab is ineffective for Crohn's disease. **European Crohn's and Colitis Organisation meeting**, Dublin, Ireland, 2011.

HUH, J. R.; LEUNG, M. W.; HUANG, P.; *et al.* Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t activity. **Nature**, v. 472, p. 486-490, 2011.

IKUNO, N.; SODA, H.; WATANABE, M.; *et al.* Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and caecum. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, p.1876-1883,1995.

IVANOV, I. I. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, p. 1121-1133, 2006.

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F.; *et al.* Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. **Immunological reviews**, DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00423.x,2016.

JAIN, R.; CHEN, Y.; KANNO, Y.; *et al.* Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. **Cell**, v. 44, p. 131-142, 2016.

JALADANKI, R. N.; WANG, J. Y. Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology. **Molecule to Function**, v.3, p. 1-114, 2011.

JOHANSSON, M.; LARSSON, J.; HANSSON, G. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of hostmicrobial interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, p. 4659-4665, 2011.

KANAMORI, M.; NAKATSUKASA, H.; OKADA M.; *et al.* Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. **Trends in Immunology**, v. 37, p.803-811, 2016.

KANG GD, LIM S, KIM DH. Oleanolic acid ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice by restoring the balance of Th17/Treg cells and inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway. **International immunopharmacology**, v.29, p.393-400, 2015.

KEEFE, D. M.; ELTING, L. S.; NGUYEN, H. T. *et al.* Risk and outcomes of chemotherapy-induced diarrhea (CID) among patients with colorectal cancer receiving multi-cycle chemotherapy. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 74, p. 675-680, 2014.

KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinion Oncology**, v. 19, p.323-327, 2007.

KLATT, N. R.; HARRIS, L. D.; VINTON, C.L.; *et al.* Compromised gastrointestinal integrity in pigtail macaques is associated with increased microbial translocation, immune activation, and IL-17 production in the absence of SIV infection. **Mucosal Immunology**, v.3, p.387-398, 2010.

KWON, Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. **Onco Targets and Therapy**, v. 9, p. 2007-2016, 2016.

KOENDERS, M. I.; *et al.* Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, p. 52, p. 3239-3247, 2005.

KOENEN, H. J.; SMEETS, R. L.; VINK, P. M, *et al.* Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. **Blood**, v. 112, p.2340-2352, 2008.

KOHN, K. W.; POMMIER, Y. Molecular and biological determinants of the cytotoxic actions of camptothecins. Perspective for the development of new topoisomerase I inhibitors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 922, p. 11 -26, 2000.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; *et al.* Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.46, p.211-220, 2000.

LEAL, F. L.; FERREIRA, F. P.; SASSE, A. D. FOLFOXIRI regimen for metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Colorectal Cancer**. DOI:10.1016/j.clcc.2017.03.012, 2017.

LECOUER, H.; LEDRU, E.; PRÉVOST, M. C.; *et al.* Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. **Journal of Immunological Methods**, v. 209, p.111-123, 1997.

LEE, C. S.; RYAN, E. J.; DOHERTY, G. A. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: the role of inflammation. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, p. 3751-3761, 2014.

LEPPKES, M.; BECKER, C.; IVANO, V.; *et al.* ROR $\gamma$ -expressing Th17 cells induce murine chronic intestinal inflammation via redundant effects of IL-17A and IL-17F. **Gastroenterology**, v.136, p.257-267, 2009.

LEWKOWICZ, P.; LEWKOWICZ, N.; SASIAK, A.; *et al.* Lipopolysaccharide-Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Regulatory Cells Inhibit Neutrophil Function and Promote Their Apoptosis and Death. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 7155-7163, 2010.

LERSCH, C.; ZEUNER, M.; BAUER, A.; *et al.* Nonspecific Immunostimulation with Low Doses of Cyclophosphamide (LDCY), Thymostimulin, and Echinacea Purpurea Extracts (Echinacin) in Patients with Far Advanced Colorectal Cancers: Preliminary Results. **Cancer Investigation**, v. 10, p. 342-348, 1992.

LIM, S. M.; JEONG, J. J.; CHOI, H. S.; *et al.* Mangiferin corrects the imbalance of Th17/Treg cells in mice with TNBS-induced colitis. **International Immunopharmacology**, v. 34, p.220-228, 2016.

LIMA-JÚNIOR RC, FIGUEIREDO AA, FREITAS HC, *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.69, p.931-942, 2012.

LIMA-JÚNIOR, R. C.; FREITAS, H. C.; WONG, D. V.; *et al.* Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 2335-2350, 2014.

- LIU, H.; HU, B.; XU, D.; *et al.* CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF- $\beta$ , and CTLA4. **The Journal of Immunology**, v. 171, p.5012-5017, p.2003.
- LONGMAN, R. S.; DIEHL, G. E.; VICTORIO, D. A.; *et al.* CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. **Journal of Experimental Medicine**, v.21, p.1571-1583, 2014.
- LUTSIK, M. E.; SEMNANI, R. T.; DE PASCALIS, R.; *et al.* Inhibition of CD4<sup>+</sup> 25<sup>+</sup> T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. **Blood**, v.105, p. 2862-2868, 2005.
- MABBOTT, N. A.; DONALDSON, D. S.; OHNO, H. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. **Mucosal Immunology**, v. 6, p. 666-677, 2013.
- MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, p.135-150, 1978.
- MARTINO, E.; VOLPE, S. D.; TERRIBLE, E. *et al.* The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, p.701-707, 2017.
- MATAR, P.; ROZADOS, V. R.; GERVASONI, S.I. *et al.* Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.50, p.588-596, 2002.
- MATRICON, J.; BARNICH, N.; ARDID, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Self Nonself**, v.1, p. 299-309, 2010.
- MAUL, J.; LODDENKEMPER, C.; MUNDT, P.; *et al.* Peripheral and Intestinal Regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T Cells in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 128, p. 1868-1878, 2005.
- MAYNARD, C. L. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3<sup>+</sup> and Foxp3<sup>-</sup> precursor cells in the absence of interleukin 10. **Nature Immunology**, v. 8, p. 931-941, 2007.

- MCGRATH JC, DRUMMOND GB, MCLACHLAN EM *et al.* Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 1573-1576, 2010.
- MCMURCHY AN, DI NUNZIO S, RONCAROLO MG.; *et al.* Molecular regulation of cellular immunity by FOXP3. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 665, p.30-46, 2009.
- MELO, M. L.; BRITO, G. A.; SOARES, R. C.; *et al.* Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 61, p. 775-784, 2008
- MIELKE LA, JONES SA, RAVERDEAU M.; *et al.* Retinoic acid expression associates with enhanced IL-22 production by  $\gamma\delta$  T cells and innate lymphoid cells and attenuation of intestinal inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, p. 1117-1124, 2013.
- MOERTEL, C. G.; SCHUTT, A. J.; REITEMEIER, R. J. *et al.* Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 56, p. 95-101, 1972.
- MOLINARO, R.; PECLI, C.; GUILHERME, R. F.; *et al.* CCR4 Controls the Suppressive Effects of Regulatory T Cells on Early and Late Events during Severe Sepsis. **Plos One**, DOI:10.1371/journal.pone.0133227, 2015.
- MONTASSIER, E.; GASTINNE, T.; VANGAY P.; *et al.* Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 42, p. 515-528, 2015.
- MOTTET, C.; UHLIG, H. H.; POWRIE, F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+ CD25+ regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, v.170, p. 3939-3943, 2003.
- MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.14, p. 667-685, 2014.
- MUKHERJEE, S. **O imperador de todos os males: uma biografia do câncer**. 1º ed, São Paulo, Companhia das Letras, 2012.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, DOI: 10.1101/cshperspect.a006049, 2012.

OGINO, H.; NAKAMURA, K.; IHARA, E.; *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells suppress Th17-responses in an experimental colitis model. **Digestive Diseases Sciences**, v. 56, p.376-86, 2011.

OH, S.Y.; CHO, K. A.; KANG, J. L.; *et al.* Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, p. 333-3340, 2013.

OHANSSON, M.E. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 15064-15069, 2008.

OMENETTI, S.; THERESA, T. P. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome. **Frontiers in Immunology**. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00639, 2015.

PABST, O. Trafficking of regulatory T cells in the intestinal immune system. **International Immunology**, v. 25, p.139-143, 2013.

PEDROSO, S. H.; VIEIRA, A. T.; BASTOS, R. W.; *et al.* Evaluation of mucositis induced by irinotecan after microbial colonization in germ-free mice. **Microbiology**, v. 161, p.1950-1960, 2015.

PELLETIER, M.; MAGGI, L.; MICHELETTI, A.; *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v.115, p.335-343, 2010.

PERROUD, H. A.; ALASINO, C. M.; RICO, M. J.; *et al.* Metastatic breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib: clinical outcomes and biomarkers of response. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, p. 365-375, 2016.

KREISL, T. N.; KIM, L.; MOORE, K.; *et al.* Phase II Trial of Single-Agent Bevacizumab Followed by Bevacizumab Plus Irinotecan at Tumor Progression in Recurrent Glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p.740-745, 2008.

RAZA, A.; SHATA, M. T. Letter: pathogenicity of Th17 cells may differ in ulcerative colitis compared with Crohn's disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.36, 2012.

REES, M.; TEKKIS, P. P.; WELSH, F. K. *et al.* Evaluation of long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: a multifactorial model of 929 patients. **Annals of Surgery**, v. 247, p. 125-135, 2008.

REIKVAM, D. H, PERMINOW, G.; LYCKANDER, L. G, *et al.* Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 46, p. 550-560, 2011.

REISSIG S.; NIKOLAEV, A.; WEIGMANN, B. The transcriptional regulator Bcl-3 impairs the function of regulatory T cells leading to the development of intestinal inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 196, 2016.

RIBEIRO, R. A.; WANDERLEY, C. W.; WONG, D. V. *et al.* Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 78, p. 881-893, 2016.

RIO-SANTOS, F.; ALVES-FILHO, J. C.; SOUTO, F. O.; *et al.* Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, p. 490-497, 2007.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **The Journal of Immunology**, v. 155, p.1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S.; WING, K.; ONISHI, Y.; *et al.* Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? **International Immunology**, v. 21, p.1105-1111, 2009.

SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v. 106, p.533-539, 1994.

SATHALIYAWALA, T. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. **Immunity**, v. 38, p. 187-197, 2013.



SATO, T.; HATATE, K.; IKEDA, A. *et al.* Treatment of advanced or recurrent colorectal cancer with irinotecan in Japan and elsewhere. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 9, p. 1223-1228, 2008.

SATOH-TAKAYAMA, N.; VOSSHENRICH, C. A.; LESJEAN-POTTIER, S. *et al.* Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. **Immunity**, v. 29, p.958-70, 2008.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, p. 821-832, 2010.

SCULLY, C.; SONIS, S.; DIZ, P. D. Oral mucositis. **Oral Disease**, v. 12, p. 229-241, 2006.

SHALOM-BARAK, T., QUACH, J.; LOTZ, M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogen-activated protein kinases and NF- $\kappa$ B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 27467-27473, 1998.

SHERIDAN, B. S, LEFRANÇOIS, L. Isolation of mouse lymphocytes from small intestine tissues. **Current Protocol in Immunology**, DOI:10.1002/0471142735.im0319s99, 2012

SHOUVAL, D. S.; BISWAS, A.; KANG, H. I.; *et al.* Interleukin 1 Beta Mediates Intestinal Inflammation in Mice and Patients with IL10 Receptor Deficiency. **Gastroenterology**, DOI: 10.1053/j.gastro.2016.08.055, 2016.

SILVA, S.S.; AQUINO, T. A. A.; SANTOS, R. M. O paciente com câncer: cognições e emoções a partir do diagnóstico. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v.4, 2008.

SÔNEGO, F.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q. Targeting neutrophils in sepsis. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, p. 1019-1028, 2014.

SONNENBERG, G. F.; MONTICELLI, L. A.; ELLOSO, M. M.; *et al.* CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. **Immunity**, v. 34, p.122-34, 2011.

SOUTO, F. O.; ALVES-FILHO, J. C.; TURATO, W. M. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 183, p. 234-342, 2011.

- SPITS, H.; CUPEDO, T. Innate Lymphoid Cells: Emerging Insights in Development, Lineage Relationships, and Function. **Annual Reviews in Immunology**, v. 30, p.647-75, 2012.
- SZNURKOWSKA, K.; ŻAWROCKI, A.; SZNURKOWSKI, J.; *et al.* Peripheral and Intestinal T-regulatory Cells are Upregulated in Children with Inflammatory Bowel Disease at Onset of Disease. **Immunology Investigations**, v. 19, 1-10, 2016.
- TAKAYAMA, T.; KAMADA, N.; CHINEN, H.; *et al.* Imbalance of NKp44<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup> and NKp44<sup>-</sup>NKp46<sup>+</sup> natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.139, p. 882-92, 2010.
- TATURA, R.; ZESCHNIGK, M.; HANSEN, W.; *et al.* Relevance of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells for early and late phases of murine sepsis. **Immunology**, v. 146, p. 144-156, 2015.
- TORCHINSKY, M.B.; BLANDER, J.M. T helper 17 cells: Discovery, function, and physiological trigger. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 1407–1421, 2010.
- TOUCHEFEU, Y.; MONTASSIER, E.; NIEMAN, K.; *et al.* Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - current evidence and potential clinical applications. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, p. 409-421, 2014.
- TRIFAN, O. C.; DURHAM, W. F.; SALAZAR, V. S, *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Research**, v. 62, p. 5778-5784, 2002.
- TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p.799-809, 2009.
- UENO, A.; GHOSH, A.; HUNG, D. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, p. 12283-12295. 2015.
- VAN HERK, E.H.; VELDE, A.A. Treg subsets in inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma: Characteristics, role, and therapeutic targets. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, DOI: 10.1111/jgh.13342, 2016

VAN SEBILLE, Y. Z.; STANSBOROUGH, R.; WARDILL, H. R.; *et al.* Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. **Current Oncology Reports**, DOI: 10.1007/s11912-015-0474-9, 2015.

VAN-VLIET, M. J.; HARMSSEN, H. J. M.; de BONT, E. S. J. M. *et al.* The Role of Intestinal Microbiota in the Development and Severity of Chemotherapy-Induced Mucositis. **Plos One**, doi.org/10.1371/journal.ppat.1000879, 2010.

VEENBERGEN, S.; SAMSOM, J. N. Maintenance of small intestinal and colonic tolerance by IL-10-producing regulatory T cell subsets. **Current. Opinion in Immunology**, v. 24, p.269-276, 2012.

VELDHOEN, M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. **Nature Immunology**, v. 18, p. 612-621, 2017.

VENDITTO, V. J, SIMANEK, E. E. Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of in vivo literature. **Molecular Pharmaceutics**, v.7, p.307-349, 2010.

VILLA, A.; SONIS, S.T. Mucositis: Pathobiology and Management. **Current Opinion in Oncology**, v. 27, p. 159-164, 2015.

VON BURG, N.; TURCHINOVICH, G.; FINKE, D. Maintenance of Immune Homeostasis through ILC/T Cell Interactions. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 416, 2015.

WALL, M. E.; MANI, M. C.; NICHOLAS, A. W. *et al.* Plant antitumor agents. Synthesis and structure activity of novel camptothecin analogs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 2689-2700, 1993.

WANG, L.; RAY, A.; JIANG, X.; *et al.* T regulatory cells and B cells cooperate to form a regulatory loop that maintains gut homeostasis and suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis. **Mucosal immunology**, v. 8, p.1297-1312, 2015.

WANG, X.; ZHU, S.; QIAN, L, *et al.* IL-1Ra selectively protects intestinal crypt epithelial cells, but not tumor cells, from chemotoxicity via p53-mediated upregulation of p21(WAF1) and p27(KIP1). **Pharmacological Research**, v. 82, p. 21-33, 2014.

WANG, Y.; LIU, X. P.; ZHAO, Z. B.; *et al.* Expression of CD4<sup>+</sup> forkhead box P3 (FOXP3)<sup>+</sup> regulatory T cells in inflammatory bowel disease. **Journal of Digestive Diseases**, v. 12, p. 286-294, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, M.; LIU, Z. W.; *et al.* The Ratio of Circulating Regulatory T Cells (Tregs)/Th17 Cells Is Associated with Acute Allograft Rejection in Liver Transplantation. **Plos One**, DOI: 10.1371/journal.pone.0112135, 2014.

WHO. World Health Organization. American Cancer Society. **Global Cancer Facts & Figures**. 3<sup>o</sup> Ed. Atlanta, 2015.

WILLIAMS, D. A. Inflammatory cytokines and mucosal injury. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 29, p. 26-30, 2001.

WLODARSKA, M. Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. **Infection and Immunity**, v.79, p. 1536-1545, 2011.

WOJNO, E. D. W.; ARTIS, D. Innate Lymphoid Cells: Balancing Immunity, Inflammation, and Tissue Repair in the Intestine. **Cell Host Microbe**, v. 12, p. 445-457, 2012.

WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, C. B.; *et al.* The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS One**, DOI:10.1371/journal.pone.0139985, 2015.

YIN, C. C.; FONG, J.; STEIN, P.L. Absence of the Fyn tyrosine kinase ameliorates T cell induced colitis by inhibiting Th17 differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 196, 2016

YU, Q. T.; SARUTA, M.; AVANESYAN, A.; *et al.* Expression and functional characterization of FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 13, p. 191-199, 2007.

ZELENAY, S.; LOPES-CARVALHO, T.; CARAMALHO, I.; *et al.* Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.102, p. 4091-4096, 2005.

ZENEWICZ, L. A.; ANTOV, A.; FLAVELL, R. A. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. **Trends in Molecular Medicine**, v; 15, p.199-207, 2009.

ZOU, Y.; LI, W. Y.; WAN, Z.; *et al.* Huangqin-Tang Ameliorates TNBS-Induced Colitis by Regulating Effector and Regulatory CD4. **BioMed Research International**, DOI:10.1155/2015/102021, 2015.

## ANEXO A



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 75/2013, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS TH1, TH2, TH17 E TREG NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO”**, de responsabilidade de Camila Fernandes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 19 de dezembro de 2013.

Fortaleza, 20 de dezembro de 2013

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA