



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

MARINA HELENA DA SILVA LOPES

**O EFEITO DO INIBIDOR DE FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE DELTA (PI3K δ)
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2021

MARINA HELENA DA SILVA LOPES

O EFEITO DO INIBIDOR DE FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE DELTA (PI3K δ)
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obter o título de mestre em Patologia. Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof.^a Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

- L854e Lopes, Marina Helena da Silva.
O Efeito do inibidor de fosfatidilinositol 3-quinase delta (PI3K δ) na mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos / Marina Helena da Silva Lopes. – 2023.
120 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Deysi Viviana Tenazoa Wong.
1. Inflamação. 2. Mucosite. 3. Irinotecano. 4. PI3K. I. Título.

CDD 571.9

MARINA HELENA DA SILVA LOPES

O EFEITO DO INIBIDOR DE FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE DELTA (PI3K δ)
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para obter o título de mestre
em Patologia. Área de concentração:
Oncologia

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a. Dra. Adriana Rolim Campos Barros
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite
BP - A Beneficência Portuguesa de São Paulo

Dedico este trabalho ao meu avô Raimundo e ao meu irmão Gabriel, por me ensinarem sobre nunca perder a minha criança interior.

AGRADECIMENTOS

Aos meus Orixás por me guiarem para vencer mais uma demanda.

À minha família pelo apoio incondicional durante esta jornada, em especial Cristiane Helena, Cris Menezes e Socorro Abib.

À minha psicóloga Yasmin Meireles e à minha psiquiatra Carolina Pinho por me ajudarem na busca pela minha saúde mental durante um ano tão difícil.

À minha orientadora Deysi Wong pela atenção, pela paciência e por todo o aprendizado.

Ao LAFICA, em especial a Lívia Nobre e Jussara Rodrigues, que tornaram tudo tão mais leve e mais divertido.

Às minhas meninas Grazihellen França e Benny Franciss, por não soltarem a minha mão durante os momentos difíceis.

À Universidade Federal do Ceará e à Pós-Graduação em Patologia, pela oportunidade.

À CAPES, à FUNCAP e ao CPNq, pelo fomento e apoio financeiro desta pesquisa.

Aos 90 animais que foram submetidos a tratamento e eutanasiados durante os treinamentos e experimentos desta pesquisa.

*“A flor que desabrocha na adversidade é a
mais bela e mais rara de todas.”*

Mulan

RESUMO

O Câncer Colorretal é um dos mais incidentes tipos de câncer, tratado com regimes de quimioterapia a base de Irinotecano que acarreta efeitos colaterais, como a mucosite intestinal, podendo atingir até 25% dos pacientes. A Mucosite é um efeito inflamatório consequente da toxicidade do acúmulo dos metabólitos do irinotecano, principalmente o SN-38 que induz a morte celular, ativa inflamassomas, interage com receptores Toll-Like 4 e promove a ativação do NF- κ B com aumentando de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-18, IL-33). As enzimas PI3K podem ser importantes intermediários na sinalização e na regulação dos TLRs. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de PI3K em sua isoforma δ na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos (n=6-8) pesando entre 20-24g (CEUA aprovado N° 5132240718). Nos camundongos, foram administrados irinotecano 75mg/kg por via i.p (via intraperitoneal) e/ou Inibidor de PI3K δ 3mg/kg via oral por 4 dias. Realizou-se, diariamente, a mensuração de peso dos camundongos. Ao 7º dia, foi realizada a eutanásia dos animais, com coleta de amostras para contagem do número total de leucócitos, dosagem de mieloperoxidase, mensuração do comprimento do intestino, morfometria do intestino, estresse oxidativo, dosagem de IL-1 β e análise da intensidade de imunofluorescência para F4/80, FOXP-3 e p-AKT. A análise estatística foi realizada pelo GraphPad Prism versão 8.0 considerando como significância estatística o $p < 0,05$. Os resultados revelaram um intenso processo inflamatório durante a inibição da enzima PI3K δ , pois animais tratados com o inibidor associado ao Irinotecano tiveram maior infiltração de neutrófilos (3428 neutrófilos/mg de tecido), aumento da expressão de macrófagos no tecido intestinal (3,8%), diminuição da expressão de células T reg (14,13%), maior perda ponderal (84,7%), diminuição do comprimento do intestino delgado (34,07 cm), diminuição da área do vilo (31,12) e alterações da arquitetura intestinal e do fígado quando comparado ao grupo irinotecano (1905 neutrófilos; 2,1%; 22%; 89,4%; 37,21 cm; 39,10 respectivamente). Além disso, o grupo que recebeu o Irinotecano combinado ao Inibidor evidenciou um aumento da expressão de fosfo-AKT quando comparado ao grupo controle negativo. Assim sendo, conclui-se que a associação de inibidores de PI3K δ e o irinotecano exacerbam o processo inflamatório, podendo acarretar maior toxicidade.

Palavras-chave: Inflamação; Mucosite; Irinotecano; PI3K.

ABSTRACT

Colorectal Cancer is one of the most common cancers, treated with chemotherapy regimens based on the chemotherapy Irinotecan, a potent inhibitor of Topoisomerase I, which, when treating the disease, causes side effects, including intestinal mucositis. Mucositis is an inflammatory effect resulting from the toxicity of the accumulation of irinotecan metabolites, mainly SN-38, which induces cell death, activates inflammasomes, interacts with Toll-Like 4 receptors, and promotes the activation of NF- κ B with increased pro-inflammatory cytokines. PI3K enzymes may be important intermediates in signaling and regulation of TLRs. Thus, the aim of this work was to evaluate the role of PI3K in its δ isoform in irinotecan-induced intestinal mucositis. Male C57BL/6 mice (n=6-8) weighing between 20-24g were used (CEUA approved No. 5132240718). In the mice, irinotecan 75mg/kg i.p. (intraperitoneal route) and/or PI3K δ inhibitor 3mg/kg orally were administered for 4 days. The weight of the mice was measured daily. On the 7th day, the animals were euthanized and samples were collected for total leukocyte count, myeloperoxidase dosage, intestinal length measurement, intestinal morphometry, oxidative stress, IL-1 β dosage, and immunofluorescence intensity analysis for F4/80, FOXP-3, and p-AKT. Statistical analysis was performed by GraphPad Prism version 8.0 considering $p < 0.05$ as statistical significance. The results revealed an intense inflammatory process during PI3K δ enzyme inhibition, as animals treated with the inhibitor associated with Irinotecan had higher neutrophil infiltration (3428 neutrophils/mg tissue), increased expression of macrophages in the intestinal tissue (3, 8%), decreased expression of reg T cells (14.13%), greater weight loss (84.7%), decreased small intestinal length (34.07 cm), decreased villus area (31.12), and changes in intestinal and liver architecture when compared to the irinotecan group (1905 neutrophils; 2.1%; 22%; 89.4%; 37.21 cm; 39.10 respectively). Furthermore, the Irinotecan + Inhibitor group evidenced increased phospho-AKT expression when compared to the negative control group. Therefore, it is concluded that the association of PI3K δ inhibitors and irinotecan exacerbate the inflammatory process and may lead to greater toxicity.

Keywords: Inflammation; Mucositis; Irinotecan; PI3K.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma* | 20 |
| Figura 2 | Estruturas químicas da Camptotecina e Irinotecano | 23 |
| Figura 3 | Mecanismo de biotransformação do Irinotecano | 25 |
| Figura 4 | Mecanismo de ação do Irinotecano | 26 |
| Figura 5 | Patogênese da mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano | 31 |
| Figura 6 | Via PI3K/Akt/mTOR | 40 |
| Figura 7 | Fluxograma de indução do modelo e administração do inibidor de PI3Kδ com as dosagens realizadas durante a pesquisa. | 45 |
| Figura 8 | Variação de Massa Corpórea dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3Kδ | 55 |
| Figura 9 | Contagem de Leucócitos Totais dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3Kδ | 56 |
| Figura 10 | Medição de comprimento intestinal dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3Kδ | 58 |
| Figura 11 | Fotomicrografias de amostras de duodeno após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3Kδ em camundongos C57BL/6 | 60 |
| Figura 12 | Fotomicrografias de amostras de jejuno após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3Kδ em camundongos C57BL/6 | 62 |
| Figura 13 | Fotomicrografias de amostras de íleo após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3Kδ em camundongos C57BL/6 | 64 |
| Figura 14 | Análise da razão vilo/cripta em segmentos intestinais após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3Kδ em camundongos C57BL/6. | 66 |
| Figura 15 | Análise da área do vilo em segmentos intestinais após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3Kδ em camundongos C57BL/6 | 68 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 16 | Fotomicrografias de amostras de colón após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3K δ em camundongos C57BL/6 | 71 |
| Figura 17 | Fotomicrografias de amostras de fígado após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3K δ em camundongos C57BL/6 | 73 |
| Figura 18 | Quantidade de neutrófilos por miligrama de tecido intestinal dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3K δ | 75 |
| Figura 19 | Concentração de MDA no tecido intestinal dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3K δ | 76 |
| Figura 20 | Fotomicrografia e quantificação da intensidade de imunofluorescência de F4/80 em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano | 78 |
| Figura 21 | Fotomicrografia e quantificação da intensidade de imunofluorescência de FOXP3 em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano | 80 |
| Figura 22 | Fotomicrografia e quantificação da expressão de fosfo-Akt (Akt fosforilado) em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano | 82 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----------|--|----|
| Quadro 1 | Escore de Lesão para os efeitos colaterais associados a Mucosite Oral e Intestinal | 29 |
| Quadro 2 | Resumo da classificação de isoformas da PI3K | 37 |
| Quadro 3 | Escores para avaliação de achados microscópicos de Macpherson e Pfeiffer | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------|--|
| ANOVA | Análise de variância |
| APC | 7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentóico)-1-piperidino]- carboniloxicamptotecina |
| CCR | Câncer colorretal |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CEUA | Comissão de Ética para o Uso de Animais |
| COX-2 | Ciclooxigenase 2 |
| CPT-11 | Irinotecano |
| CTCAE | Termologia de Critérios Comuns para Efeitos Adversos |
| DAMPs | Padrões moleculares associados a danos |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DTNB | 5,5'-ditiobis-(2-ácidonitrozênzóico) |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGFR | Receptor do fator de crescimento epidérmico |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimático |
| ERO | Espécies reativas de Oxigênio |
| F4/80 | Módulo semelhante ao EGF com receptor de hormônio mucina tipo 1 |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FGFR | Receptor do factor de crescimento de fibroblastos |
| FOXP3 | Fator de transcrição de proteína FOX P3 |
| GSH | Glutaciona |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| hCE | Carboxilesterases hepáticas |

| | |
|--------------|--|
| HE | Hematoxilina-Eosina |
| HMGB1 | Proteína de alta mobilidade Box 1 |
| HTAB | Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio |
| IGF-1R | Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina 1 |
| iNOS | Óxido Nítrico |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IL-1R | Receptor de Interleucina 1 |
| IL-1 β | Interleucina 1 Beta |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-17A | Interleucina 17 A |
| IL-18 | Interleucina 18 |
| IL-33 | Interleucina 33 |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| IRI | Irinotecano |
| KC | Quimiocina análoga à IL-8 humana em camundongos |
| KCl | Cloreto de Potássio |
| LAFICA | Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer |
| LLC | Leucemia linfóide crônica |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MDA | Dialdeído Malônico |
| MPO | Mieloperoxidase |
| mTOR | Alvo de mamíferos da rapamicina |
| Myd88 | Fator de diferenciação mielóide 88 |

| | |
|------------------|--|
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NF- κ B | Fator de transcrição nuclear kappa B |
| NPC | 7-ethyl-10-[4-N-(1-piperidino)-1-amino]carbonyloxycamptothecin |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| p-AKT | AKT fosforilada |
| PAMPs | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PBS | Tampão salina fosfato |
| PFAF | PLANTS FOR THE FUTURE |
| PI | Fosfatidilinositol |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-Quinase |
| PI3P | Fosfatidilinositol 3-Fosfato |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensageiro |
| RTKs | Receptores de Tirosina Quinases |
| SF | Soro Fisiológico |
| SN38 | 7-etil-10-hidroxicamptotecina |
| SN38G | SN-38 glicuronídeo |
| TBARS | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| TLR | Receptor Toll-like |
| TMB | 3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| Tregs | Linfócitos T reguladores |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---------------|--------------------------|
| α | Alfa |
| β | Beta |
| δ | Delta |
| γ | Gamma |
| κ | Kappa |
| ® | Marca Registrada |
| °C | Graus Celsius |
| g | Gramma |
| kg | Quilograma |
| M | Molar |
| mg | Miligramma |
| mL | Mililitro |
| nm | Nanômetro |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| % | Porcentagem |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 Câncer Colorretal | 20 |
| 1.2 Irinotecano | 22 |
| 1.3 Mucosite induzida por Irinotecano | 27 |
| 1.4 Isoformas de Fosfatidilinositol 3-Quinase no contexto da Inflamação e Câncer 34 | |
| 1.5 Fosfatidilinositol 3-Quinase delta (PI3K δ) | 38 |
| 1.6 Justificativa | 42 |
| 2 OBJETIVOS | 44 |
| 2.1 Objetivo Geral | 44 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 44 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 3.1 Fluxograma de Atividades | 45 |
| 3.2 Aspectos Éticos | 45 |
| 3.3 Animais | 46 |
| 3.4 Drogas | 47 |
| 3.5 Modelo de Mucosite Intestinal induzida pelo irinotecano | 47 |
| 3.6 Grupos experimentais e Avaliação dos Parâmetros Gerais da Indução da Mucosite | 47 |
| 3.6.1 Grupos Experimentais: | 47 |
| 3.6.2 Parâmetros gerais de mucosite: | 48 |
| 3.7 Estresse Oxidativo | 50 |
| 3.8 Imunofluorescência | 51 |
| 3.9 Análise Estatística | 52 |
| 4 RESULTADOS | 54 |
| 4.1 O inibidor de PI3K delta associado ao Irinotecano potencializa a perda de massa corpórea em camundongos | 54 |
| 4.2 O Inibidor de PI3K delta não interfere na leucopenia em camundongos | 55 |
| 4.3 O uso do Inibidor de PI3K delta sozinho e associado ao irinotecano reduz o comprimento intestinal e promove alterações no intestino delgado | 57 |
| 4.4 O uso do inibidor de PI3K delta associado ao Irinotecano altera a morfometria intestinal de camundongos | 65 |
| 4.5 O uso do Inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano reduz o comprimento intestinal e promove alterações no colón e fígado | 69 |
| 4.6 O inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano promove a migração de neutrófilos para o intestino | 74 |

| | |
|---|------------|
| 4.7 O inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano não altera o estresse oxidativo em amostras de intestino..... | 76 |
| 4.8 Quantificação da expressão de marcadores para macrófagos, Células T regulatórias e vias de sinalização intracelular em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano | 77 |
| 5 DISCUSSÃO | 84 |
| 6 CONCLUSÃO | 95 |
| REFERÊNCIAS | 96 |
| ANEXOS | 116 |
| ANEXO 1 | 116 |
| ANEXO 2 | 117 |
| ANEXO 3 | 118 |
| ANEXO 4 | 119 |

1 INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação usada para o conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células de tecidos e órgãos. Essas células, ao se dividirem rapidamente, tendem a ter um comportamento mais agressivo, com desenvolvimento de mecanismos de evasão das ferramentas dispostas pelo organismo para o seu controle e induzindo a formação de tumores. Podendo acometer diferentes tipos de células do corpo e promover a invasão de tecidos e órgãos vizinhos através de um mecanismo chamado metástase (American Cancer Society, 2017).

Nos dias de hoje, o câncer ainda preocupa e desafia os profissionais, a ciência e a saúde, sendo estudada como uma patologia de alta incidência e alta prevalência. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde - OMS (2020), surgirão entre 29 a 37 milhões de novos casos até o ano de 2040, significando assim um aumento de 60% (em média) em comparação aos 18,1 milhões de pacientes diagnosticados com tumores malignos em 2018 (NEWSLAB, 2020) Nesse mesmo ano de 2018, foi publicado um estudo de estimativas no jornal da Sociedade Americana de Câncer, correlacionando a mortalidade com os números publicados no site da Globocan. Esse estudo mostrou que somente naquele ano, haveria 9,5 milhões de óbitos por câncer, exceto pele não melanoma (BRAY et al., 2018).

Dentre os tipos de cânceres mais comuns, temos o câncer colorretal. De acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), conforme ilustrado na Figura 1, dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o triênio 2020-2022, o câncer colorretal é o segundo mais incidente entre homens e mulheres no Brasil, podendo chegar até 9,2% dos casos totais (INCA, 2020). Ou seja, estimam-se que só no Brasil,

para cada ano surgirão 20.520 casos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 em mulheres (INCA, 2020).

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*. Fonte: INCA, 2020.

| Localização primária | Casos | % | | | Localização primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|---|--|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata | 65.840 | 29,2% | Homens  Mulheres  | | Mama feminina | 66.280 | 29,7% |
| Cólon e Reto | 20.540 | 9,1% | | | Cólon e Reto | 20.470 | 9,2% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 17.760 | 7,9% | | | Colo do útero | 16.710 | 7,5% |
| Estômago | 13.360 | 5,9% | | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.440 | 5,6% |
| Cavidade Oral | 11.200 | 5,0% | | | Glândula Tireoide | 11.950 | 5,4% |
| Esôfago | 8.690 | 3,9% | | | Estômago | 7.870 | 3,5% |
| Bexiga | 7.590 | 3,4% | | | Ovário | 6.650 | 3,0% |
| Linfoma não Hodgkin | 6.580 | 2,9% | | | Corpo do útero | 6.540 | 2,9% |
| Laringe | 6.470 | 2,9% | | | Linfoma não Hodgkin | 5.450 | 2,4% |
| Leucemias | 5.920 | 2,6% | | | Sistema Nervoso Central | 5.230 | 2,3% |

* Números arredondados para múltiplos de 10

1.1 Câncer Colorretal

O Câncer Colorretal é descrito como uma neoplasia de desenvolvimento lento que ocorre nas paredes do revestimento interno do cólon e/ou do reto. Esse crescimento é denominado inicialmente de adenoma, que pode se tornar canceroso ao formar vasos sanguíneos e linfáticos ao seu redor adquirindo uma maior capacidade invasiva. Cerca de 95% dos casos são atribuídos a adenocarcinomas, provenientes das glândulas mucosas desse órgão, mas também podem ser classificados como tumores estromais, linfomas ou sarcomas, dependendo de suas características (MARLEY & NAN, 2016).

Os sintomas são variáveis pois dependem da localização e tipo do tumor. Diarreia e síndrome dispéptica podem estar dentre os sintomas iniciais (DA SILVA; ERRANTE, 2016), podendo ser seguidos de obstipação intestinal progressiva, fezes afiladas, escuras ou eventualmente com sangue, nos estágios decorrentes. Durante todo o estadiamento da doença, pode haver a alternância entre diarreia e constipação. Nos

casos onde o tumor se encontra na parte retal, são constantes as evacuações com presença de sangue, muco ou exsudato inflamatório, associados à sensação de evacuação incompleta (BALLESTER *et al.*, 2016).

Os fatores de risco são alguns dos mais comuns para a maioria das doenças oncológicas como: consumo excessivo de bebidas alcoólicas, ingestão de gordura animal, tabagismo, dieta pobre em fibras alimentares, consumo de produtos industrializados ou em conservas, doenças crônicas intestinais e falta de exercícios (MARLEY & NAN, 2016). Estima-se que 75% dos casos desse tipo de câncer sejam não-hereditários (DA SILVA *et al.*, 2016), geralmente associados à mutações no oncogene K-ras, genes supressores de tumor APC, DCC e p53 e genes reparadores do DNA, MSH2, MLH1, PMS2 e MSH6, onde pode ocorrer a instabilidade cromossômica ou perda de heterozigose inativando assim esses genes (DA SILVA; ERRANTE, 2016).

Geralmente o CCR (Câncer Colorretal) é diagnosticado em fases mais tardias, sempre havendo uma dificuldade em detectar precocemente esse tipo de câncer devido às suas manifestações clínicas iniciais que também podem indicar algo mais comum e menos grave como uma verminose. Para o diagnóstico, os exames de imagem como colonoscopia e retossigmoidoscopia flexível oferecem maior conforto para o paciente e o examinador, também sendo possível a coleta de amostras de secreções e tecidos para biopsia a partir desses exames (CÂRȚĂNĂ *et al.*, 2016).

O tratamento desse tipo de câncer pode ser feito através de remoção cirúrgica, podendo extirpar tumores em estágios iniciais em pequenas quantidades ou reunidos em alguma área afetada do intestino, ou pode ser realizada a quimioterapia citotóxica em casos de tumores metastáticos (LEAL *et al.*, 2017). Em contrapartida, a terapia antineoplásica submete ao paciente efeitos colaterais inespecíficos e diversos. O

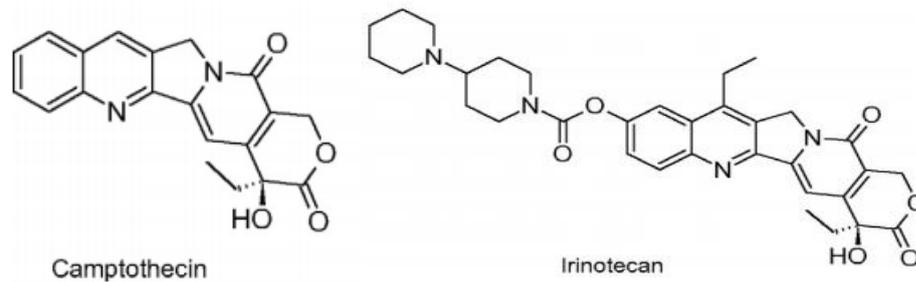
paciente sob tratamento pode apresentar sintomas como: alopecia, náuseas e vômitos, diarreia, constipação, anemia, mucosite, leucopenia, neutropenia, fadiga, anorexia, dispepsia e mielossupressão (SALMON & SARTORELLI, 2014).

1.2 Irinotecano

O irinotecano (**Figura 2**) é um derivado semi-sintético da camptotecina (CPT), um alcaloide extraído e isolado de uma árvore ornamental originária das regiões da China e do Tibet, *Camptotheca acuminata*, onde é popularmente conhecida como *xi shu* (árvore feliz) (PFAF, 2020).

Essa substância foi primeiramente isolada nos Estados Unidos, por Wall *et al.*, em 1966, dando origem ao Topotecan® e ao Irinotecan®, esse último sendo moderadamente solúvel em água e solventes orgânicos, que atuam inibindo a topoisomerase I (CAMPBELL *et al.*, 2016). Devido a topoisomerase ser o alvo celular dessa substância, no final dos anos 80 foram feitas modificações na estrutura do CPT, contribuindo assim para o seu potente mecanismo de ação antitumoral. (MARTINO *et al.*, 2017).

Figura 2 – Estruturas químicas da Camptotecina e Irinotecano.



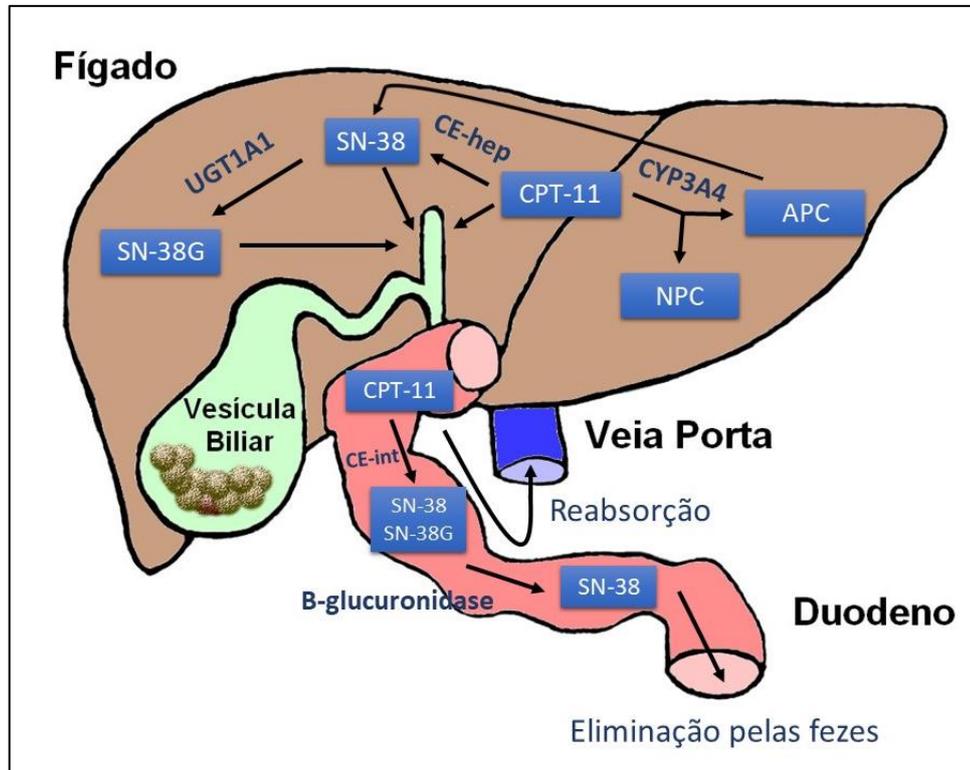
Estruturas químicas da Camptotecina e do seu derivado o Irinotecano, inibidores de Topoisomerase 1 que formulam o quimioterápico Irinotecano. Imagem e Fonte: MARTINO *et al.*, 2017.

O CPT foi aprovado e liberado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para ser usado em ensaios clínicos contra carcinomas e como agente para o tratamento de câncer humano (MARTINO *et al.*, 2017). Em meados dos anos 90, precisamente em 1994, o CPT-11 passou a ser disponibilizado no Japão sendo usado no tratamento de carcinoma de pulmão, colo de útero e ovário. Mais tarde, em 1996, no Estados Unidos, o CPT é aprovado para ser utilizado no tratamento de câncer colorretal metastático refratário, onde a sua administração era associada ao 5-fluorouracil, posteriormente sendo aprovado a sua associação ao 5-fluorouracil e ao leucovorin para o tratamento de primeira linha do câncer colorretal metastático (FUJITA *et al.*, 2015).

Assim, o irinotecano tem sido utilizado como agente único ou combinado com outros quimioterápicos em protocolos para tratamento de primeira e segunda linha de câncer colorretal (BINEFA *et al.*, 2014), no câncer de ovário (LIU *et al.*, 2015), no câncer de pulmão de células pequenas e não pequenas (YANG *et al.*, 2015), no câncer de pâncreas (PETRELLI *et al.*, 2017), no câncer de mama (TWELVES *et al.*, 2016) e no de estômago (WAGNER *et al.*, 2017).

O mecanismo de biotransformação do irinotecano (**Figura 3**) se dá no fígado, onde o CPT-11 é metabolizado pelas carboxilesterases hepáticas 1 e 2 (hCE) que o transformam em SN-38. Por sua vez, o SN-38 é depurado pela UGT1A1/7 a glicuronídios de SN-38 (SN38G), sendo esse composto sem atividade biológica. Concomitantemente, sob a ação da enzima CYP3A4, o CPT-11 é convertido também nos seus metabólitos inativos, sendo eles: APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin) e NPC (7-ethyl-10-[4-N-(1-piperidino)-1-amino]carbonyloxycamptothecin) (CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSEN RON *et al.*, 2004). No caso, o APC pode ser também metabolizado, formando maiores quantidades de SN-38. O NPC é metabolizado completamente em SN-38 pela CYP3A4, colaborando na atividade e toxicidade do CPT-11 *in vivo* (RIVORY; REN, 1997; MATHIJSEN RON *et al.*, 2004).

Figura 3 – Mecanismo de biotransformação do Irinotecano.

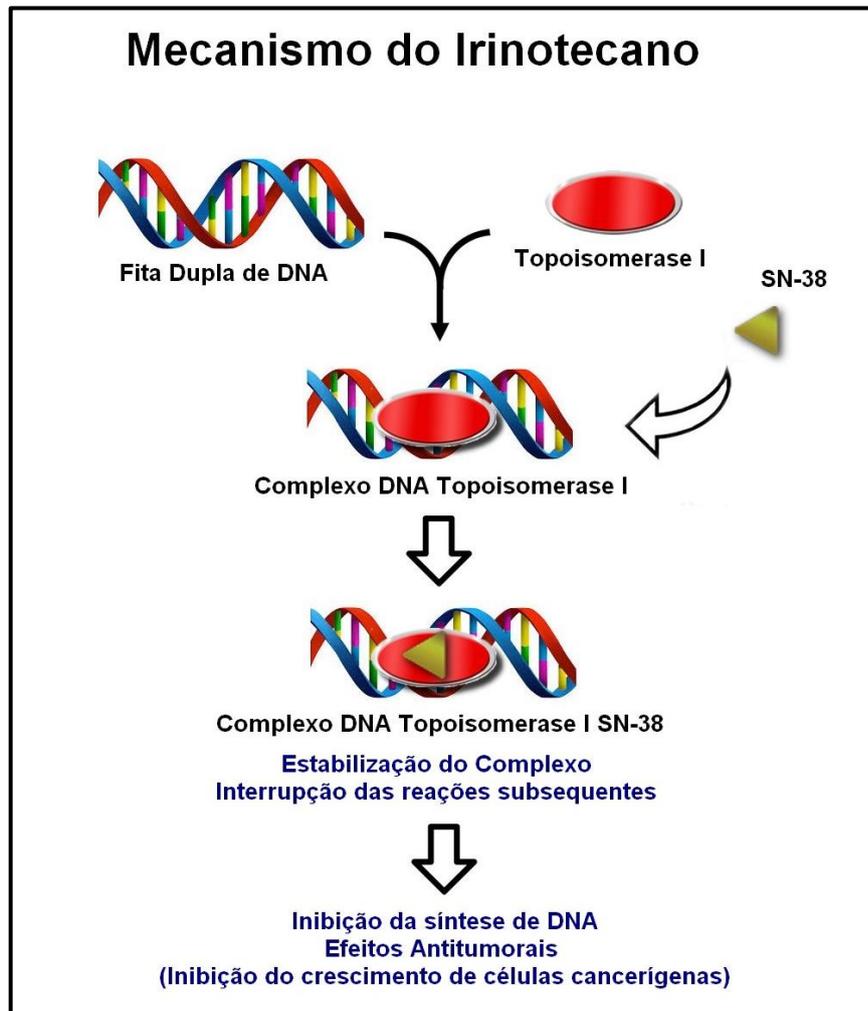


Os metabólitos ativos e inativos passam pela bile e chegam ao intestino delgado. Estima-se que de 60 a 70% do CPT-11 é eliminado pelas fezes, 25% pela bile e 10 a 20% pela urina. Com a bile, o CPT-11, o SN-38 e o SN-38G passam pelo intestino delgado, onde uma parte é excretada; o SN-38G pode ser desconjugado e re-transformado em SN-38 com a ação de β -glucuronidases bacterianas (provenientes de *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*). Ao decorrer do processo, o SN-38 e o irinotecano podem ser reabsorvidos através da veia porta, retornando ao fígado, por um processo chamado de recirculação entero-hepática. Imagem: Própria Autora.

O mecanismo citotóxico do irinotecano (**Figura 4**) é realizado pela inibição seletiva da enzima topoisomerase I (Topo I) que atua na replicação, transcrição, recombinação e no reparo do DNA. A Topo I, realiza uma ligação covalente com a estrutura dupla hélice do DNA, ocasionando a quebra de uma das suas fitas, possibilitando um afrouxamento da supertorção que permite a replicação do seu material. Após esse afrouxamento, a Topo I liga as duas cadeias de DNA, promovendo a integridade da estrutura. Com a ação do irinotecano, um complexo não covalente é formado entre a Topo I e as fitas de DNA, provocando uma quebra irreversível na cadeia de DNA,

impedindo a recombinação da fita dupla e em consequência, acarretando a morte celular (MARTINO *et al.*, 2017).

Figura 4 – Mecanismo de ação do Irinotecano.



O mecanismo do Irinotecano se dá pela união do SN-38 com o Complexo DNA Topoisomerase I. Após a estabilização dessa união, ocorre a interrupção de todas as reações subsequentes, no caso a inibição da síntese de DNA, ocasionando os efeitos antitumorais desejados, inibindo o crescimento de células cancerígenas. Imagem: Próprio Autor. Fonte: SATO *et al.*, 2008.

Mesmo com o irinotecano demonstrando um ótimo resultado na atividade antitumoral durante os tratamentos, foram observados efeitos adversos graves (MARTINO *et al.*, 2017). O efeito tóxico do irinotecano é causado pelo acúmulo dos seus metabólitos, principalmente do SN-38 no intestino (GUPTA *et al.*, 1994), constatando que a mucosite gastrointestinal e a diarreia se apresentam como dois dos

efeitos colaterais mais observados relacionados ao uso desse agente citotóxico, afetando negativamente o sucesso do tratamento antitumoral (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Em modelos experimentais, o irinotecano causou toxicidade intestinal significativa, onde os primeiros sintomas apareceram 6h após sua administração, sendo observados danos histológicos graves no intestino delgado e grosso ao final do experimento, 120h após sua administração (WARDILL *et al.*, 2014).

1.3 Mucosite induzida por Irinotecano

A Mucosite Gastrointestinal é um efeito adverso inflamatório associado ao tratamento quimioterápico, recorrentemente citada com uma das mais comuns consequências da toxicidade dentre os pacientes (CHAVES & GORINI, 2011). Esse termo clínico é usado para descrever as alterações decorrentes da quimioterapia e da radioterapia antineoplásicas que acometem as mucosas do trato alimentar de maneira generalizada ou localizada (SONIS *et al.*, 2004; SONIS; FEY, 2002; SCULLY; SONIS; DIZ, 2006).

Caracteriza-se por apresentar dor, ulceração, náuseas, vômitos, sangramento, constipação e diarreia (MAYO *et al.*, 2017). Essas manifestações clínicas são resultantes da ação dos agentes antineoplásicos sobre as células da mucosa gastrointestinal e da alta taxa de proliferação do epitélio (GIBSON & KEEFE, 2006).

O sintoma mais observado no quadro de mucosite intestinal induzida pela quimioterapia à base de irinotecano é a diarreia, onde é desenvolvida em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo que 25% dos casos apresentam, já nos primeiros ciclos de tratamento, diarreia de grau 3-4 (mais de 7

episódios de diarreia por dia havendo a necessidade de hidratação por um período superior a 24h) (CINAUSERO *et al.*, 2017).

A mucosite induzida por irinotecano também está associada a lesões histopatológicas em células caliciformes e em células nervosas entéricas. Estes fenômenos podem ser resultantes de uma sinalização inflamatória regulada pelo próprio irinotecano. Os danos nas células tegumentares e nos nervos entéricos afetam a secreção e a motilidade do intestino durante a quimioterapia e o tratamento radioterápico, podendo resultar numa alteração da função intestinal (THORPE *et al.*, 2020).

Em dados gerais sobre a mucosite, sabemos que cerca de 5-15% dos pacientes podem ser acometidos pelo estágio mais grave de toxicidade (Grau 4), como demonstrado no **Quadro 1**. Destes, aproximadamente 35% sofrerão um atraso nos ciclos subsequentes de quimioterapia, 60% irão requerer redução nas doses aplicadas e 30% optarão pela descontinuação do tratamento. Em geral, 60% apresentam febre e esse quadro pode levar a um episódio de hospitalização (KEEFE *et al.*, 2007). Além disso, a neutropenia comumente observada na quimioterapia quando associada à mucosite chega a elevar em quatro vezes o risco de sepse (KRISHNA *et al.*, 2011) o que não seria interessante para o paciente em tratamento oncológico podendo ocasionar o atraso ou descontinuação do mesmo, o que comprova que a mucosite é um relevante e dispendioso efeito colateral muitas vezes dose-limitante (PETERSON *et al.*, 2011).

Quadro 1 – Escore de Lesão para os efeitos colaterais associados a Mucosite Oral e Intestinal. Fonte: COMMON TERMINOLOGY CRITERIA FOR ADVERSE EVENTS, 2020. CTCAE v5.0

| Escores | Mucosite Intestinal induzida por Quimioterapia (Diarreia) |
|------------------------|--|
| Grau 0 (Nenhum) | Sem diarreia |
| Grau 1 (Leve) | <4 episódios de diarreia por dia |
| Grau 2 (Moderado) | De 4 a 6 episódios de diarreia por dia; Hidratação <24h |
| Grau 3 (Grave) | ≥ 7 episódios de diarreia por dia; Hidratação ≥ 24h |
| Grave 4 (Risco à Vida) | Risco à vida |
| Grau 5 (Morte) | Morte |

Durantes as últimas décadas, o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) vem elucidando questões sobre a Mucosite, sendo referência no assunto com pesquisas e publicações. Em 2008, o LAFICA padronizou o seu modelo experimental de mucosite intestinal onde utiliza o protocolo, devidamente adaptado para suas condições experimentais, de 75mg/kg/dia de irinotecano, por 4 dias consecutivos, em camundongos swiss, realizando a eutanásia no quinto ou sétimo dia. De acordo com esse modelo, os animais apresentam diarreia e dano intestinal, com encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas, vacuolização epitelial, hiperplasia de células calciformes e intenso infiltrado celular (MELO *et al.*, 2008). Além disso, Melo e colaboradores evidenciaram o papel protetor de talidomida e pentoxifilina, ambos inibidores de citocinas pró-inflamatórias (MELO *et al.*, 2008).

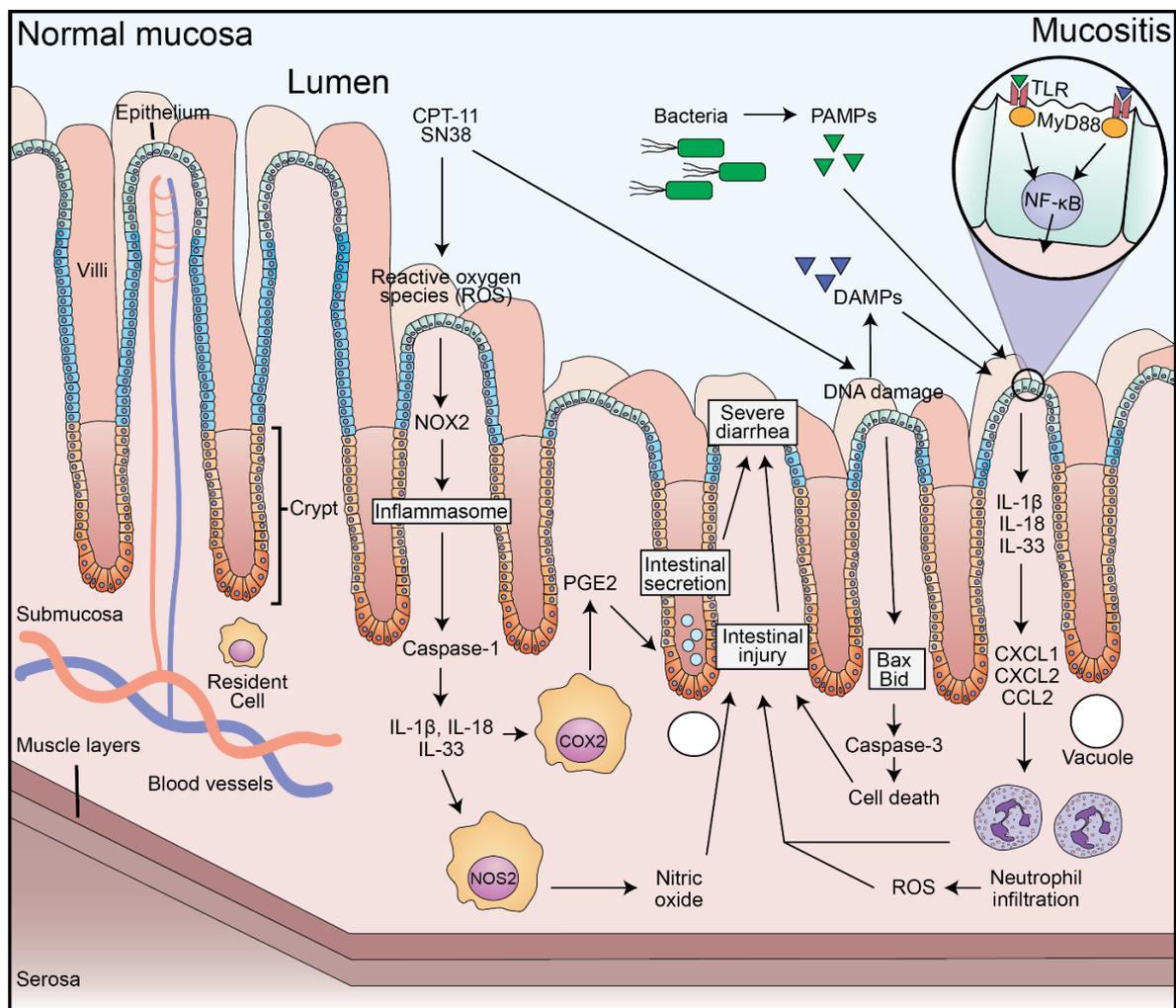
Posteriormente, Lima-Júnior e colaboradores mostraram o papel do óxido nítrico (iNOS) na mucosite intestinal. Os autores utilizaram camundongos geneticamente modificados (knockout) para iNOS, assim como, a modulação farmacológica com a aminoguanidina (inibidor seletivo da iNOS) e mostraram uma melhora nos parâmetros inflamatórios, como MPO, dosagem de citocinas (IL-1 β e KC), expressão de iNOS por Western Blotting. Em adição, esse trabalho mostrou, de forma inédita, o papel da loperamida na hipercontratilidade induzida pelo irinotecano sem alterar os parâmetros inflamatórios (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

A patogênese da mucosite (**Figura 5**) ocorre na indução da morte celular por apoptose pelo irinotecano e SN-38, com formação de espécies reativas de oxigênio, que ativam inflamassomas via caspase-1, gerando IL-1 β , IL-18 (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014) e IL-33 (GUABIRABA *et al.*, 2014). Essas interleucinas vão induzir as células do epitélio a expressarem COX-2 e iNOS, o que resulta na produção de prostaglandinas e óxido nítrico, levando a ocorrência do dano intestinal.

A administração de irinotecano também está associada ao aumento da translocação bacteriana e acumulação de neutrófilos no intestino, levando ao dano tecidual (WONG *et al.*, 2015). Conseqüentemente, os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) e Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs) estimulam os receptores Toll-Like (TLRs) para a ativação do NF- κ B, que por sua vez aumenta ainda mais a expressão de citocinas pró-inflamatórias (WONG *et al.*, 2015). Essas citocinas promovem a produção de quimiocinas (CXCL1, CXCL2 e CCL2) tendo como resultado o recrutamento de neutrófilos, amplificando a geração de espécies reativas de oxigênio, o que leva ao dano intestinal, ao aumento de secreção no epitélio e a diarreia severa (LEE; RYAN; DOHERTY, 2014; WONG *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Acredita-se que a apoptose das células nesse processo seja decorrente da ativação de proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas (BAX e BAK), presentes no intestino delgado. Subsequentemente, temos o aumento da permeabilidade entre as junções comunicantes dessas células, aumentando assim a susceptibilidade à translocação bacteriana na lâmina própria intestinal (BOWEN *et al.*, 2006 *apud* RIBEIRO *et al.*, 2016).

Figura 5 – Patogênese da mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano.



O CPT-11 interage com a mucosa através de DAMPs e PAMPs nos receptores TLRs gerando EROs e a cascata da Caspase-1 ativando as Interleucinas 1 β , 18 e 33, liberando óxido nítrico. Esse processo induz a lesão intestinal, a descamação do epitélio colunar simples do intestino, a secreção intestinal e a diarreia. Fonte: RIBEIRO *et al.*, 2016.

Ainda em trabalhos sobre essa patogênese, observamos que as células Th17 e Tregs foram encontradas em grande quantidade na superfície das mucosas orais e intestinais, tendo elas o papel de proteger o hospedeiro de patógenos, no caso das Th17, ou controlar o dano causada na resposta inflamatória que pode ser exacerbada, nesse caso esse seria o papel das Tregs. Então, é importante o equilíbrio dessas subpopulações para a manutenção da homeostasia intestinal (OMENETTI & PIZARRO, 2015).

Fernandes e colaboradores (2018) mostraram o envolvimento de células Th17 e Tregs, tanto intestinais quanto sistêmicas, na patogênese da mucosite intestinal experimental induzida pelo irinotecano. Esse trabalho também observou o aumento da frequência dessas células no intestino e no baço dos animais submetidos ao experimento, correlacionando com intensa diarreia e significativo dano histopatológico. Houve um aumento na taxa de neutrófilos no intestino ao longo dos dias, apresentando o pico máximo no quinto dia de experimento e mostrando subsequente decréscimo até o sétimo dia, comparado a acumulação de células Tregs (FERNANDES *et al.*, 2018).

Dados do LAFICA mostram o envolvimento de mediadores inflamatórios reguladores da imunidade inata e adaptativa na mucosite intestinal, como KC (quimiocina análoga à IL-8 humana em camundongos), TNF- α , IL1- β , IL-18, IL-33 (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2016). Essas pesquisas também mostraram que o irinotecano aumenta a expressão de MyD88 (200%), TLR9 (400%), TRAF6 (236%), IL-1 β (405%), IL-18 (365%), COX-2 (2,777%) e NF-kB (245%) e que a deleção genética de MyD88, TLR2 ou TLR9 reduz a lesão intestinal (WONG *et al.*, 2015).

Por ancoragem molecular, o SN-38 ocupa a cavidade hidrofóbica do MD-2, uma molécula que forma um complexo com TLR4 e que confere resposta de lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano gram-negativo (HOLANDA, 2018). O que possibilita ao SN-38 interagir com o mesmo sítio que liga o LPS. Além disso, em um estudo com células RAW 264.7 observou-se uma resposta muito reduzida do LPS na presença de SN-38, mas a atividade total celular foi restabelecida quando incubada na presença de maiores concentrações de LPS, o que sugere um forte antagonismo competitivo reversível (WONG *et al.*, 2019). Esse mecanismo colabora no desenvolvimento de uma resposta anti-inflamatória precoce paradoxal, aumentando assim a mucosite associada ao irinotecano em fases mais tardias em decorrência da falta de controle imunológico inato da infecção em progresso. Em modelos experimentais, camundongos nocaute para TLR4 apresentam exacerbação da mucosite e aumento da taxa de mortalidade desses animais, mostrando assim que uma sinalização precoce desse receptor pode influenciar na dinâmica da doença (WONG *et al.*, 2019).

A ativação de TLR4 é resultado da formação de um complexo entre a enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) com a proteína MyD88 em que a atividade da PI3K induz a produção de citocinas (IL-1 β e TNF- α) (OJANIEMI *et al.*, 2003). Levando em consideração que vários membros da família de receptores TLR/IL-1R estão presentes no desenvolvimento da mucosite intestinal (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016), acredita-se então que as enzimas PI3K podem ser importantes intermediários na sinalização e na regulação desses receptores.

1.4 Isoformas de Fosfatidilinositol 3-Quinase no contexto da Inflamação e Câncer

As enzimas Fosfatidilinositol 3-Quinases (PI3K) são dímeros pertencente à família de lipídios-quinases presentes no meio intracelular (GIUDICE & SQUARIZE, 2013) estudadas pela primeira vez em 1985 por Cantley e Whitman., que catalisam a fosforilação de um ou mais fosfoinosítídeos de inositol na posição 3 do anel (**Figura 6**). O anel de inositol 3-fosforilado, por sua vez, cria um sítio de ancoragem para proteínas provenientes da parte interna da membrana plasmática e das membranas intracelulares. Esses fosfoinosítídeos já fosforilados são submetidos à ação de fosfatases que removem o próprio 3-fosfato ou os fosfatos adicionais nas posições próximas, como 4 ou 5. Nessa reação, substratos e produtos são fosfolipídios que permanecem e atuam nas membranas (OKKENHAUG, 2013). A função dessas PI3Ks é gerar mensageiros moleculares específicos nas membranas, incluindo o controle de tráfego intracelular de vesículas, motilidade das células, o metabolismo de nutrientes e aspectos mais especializados requeridos para o desenvolvimento e funcionamento de células imunes (OKKENHAUG, 2013; HAWKINS; STEPHENS, 2015).

Nas células dos mamíferos, são encontrados oito tipos de PI3Ks classificadas em três famílias (**Quadro 2**), distintas por seus achados estruturais, distribuição tecidual, mecanismos de ativação, função e substratos lipídicos específicos (GIUDICE; SQUARIZE, 2013; HAWKINS; STEPHENS, 2015):

- Classe I: contendo quatro isoformas (PI3K α , β , γ , δ)
- Classe II: contendo três isoformas (PI3KC2 α , β , γ)
- Classe III: contendo uma única isoforma (PI3KC3)

As PI3Ks de classe I fosforilam seletivamente o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI (4,5) P2) para formar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI (3,4,5) P3, esse último

comumente denominado de PIP3 (WHITMAN, DOWNES, KEELER, 1988). A regulação dessas PI3Ks de classe I são feitas direta ou indiretamente pelos receptores da superfície celular e desempenhando assim funções importantes nos eventos iniciais do processo de transdução de sinal que fluem da ativação desses receptores (HAWKINS & STEPHENS, 2015). Essas PI3Ks são distribuídas em IA e IB, onde as da classe IA estão mais associadas ao câncer. A PI3K é formada por um domínio catalítico p110 e um domínio regulador p85, onde três isoformas são de p110, denominadas como p110 α (codificado por PIK3CA), p110 β e p110 δ (Bruhn et al., 2013). Dentre essas três, p110 δ é expressa quase que exclusivamente em leucócitos, p110 α e p110 β são expressas de maneira geral em todos os tipos de células (CANTLEY, 2002). Em humanos, as subunidades reguladoras PI3K 1 (PIK3R1), PIK3R2 e PIK3R3 codificam p85 α (ou sua variante p55 α ou p50 α), p85 β , e p55 γ , respectivamente (MUKOHARA, 2015; PADDOCK; FIELD; CANTLEY, 2019).

A classe IA é ativada por RTKs (Receptors Tyrosine Kinases) como EGFR, FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) e IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) (GIUDICE & SQUARIZE, 2013). A classe IB é ativada por receptores acoplados à proteína G (Fresno Vara et al., 2004). Todas as subunidades catalíticas da classe I contém domínios de ligação para Ras GTPases e a ligação desses domínios a certas proteínas RAS contribui para a sua ativação (JIMÉNEZ *et al.*, 2002).

A classe II apresenta as isoformas menos aprofundadas dentre as três classes. Elas são capazes de sintetizar fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) ou fosfatidilinositol (PI) na membrana ou nos endossomos em resposta à estimulação de receptores (FALASCA & MAFFUCCI, 2012). Acredita-se que esses lipídios podem desencadear eventos regulatórios análogos aos que são provocados pelas PI3K de classe III e I (HAWKINS & STEPHENS, 2015).

A classe III de PI3K fosforila PI para formar PI3P em sítios intracelulares específicos, como por exemplo endossomos e estruturas autofagocíticas precoces, regulando assim a função dessas estruturas pela ligação de domínios efetores (SCHINK *et al.*, 2013). A única subunidade catalítica da classe III é conhecida como Vps34, como referência à sua descoberta inicial ter sido em *S. cerevisiae*. Essa subunidade se liga a uma proteína quinase envolvida em sua regulação (HAWKINS & STEPHENS, 2015), onde atua como uma proteína adaptadora, sendo necessária no processo de autofagia das células e na estimulação de aminoácidos do alvo mecanicista da atividade da rapamicina (mTOR) em células de mamíferos (OKKENHAUG, 2013).

Quadro 2 – Resumo da classificação de isoformas da PI3K. Fonte: STARK *et al.*, 2015.

| | Isoformas | Distribuição de tecidos | Substrato | Produtos | Moléculas adaptadoras |
|-------------------|---------------|--------------------------------|-------------------------|---|--|
| Classe IA | p110 α | Onipresente | PI (4,5) P ₂ | PI (3,4,5) P ₃ tcp PIP ₃ | p85 α (p50 α , p55 α); p85 β ; p55 γ |
| | p110 β | Onipresente | | | |
| | p110 δ | Leucócitos, neurônios | | | |
| Classe IB | p110 γ | Leucócitos, miócitos cardíacos | PI (4,5) P ₂ | PI (3,4,5) P ₃ | p101 / p84 / p87 |
| Classe II | C2 α | Epitélio, endotélio | PI, PI4P | PI3P, PI (3,4) P ₂ | |
| | C2 β | Onipresente | | | |
| | C2 γ | Hepatócitos | | | |
| Classe III | Vps34 | Onipresente | PI | PI3P | VPS15 (p150) |

Resumidamente, as PI3Ks têm função celular regulatória importante, exemplo disso é a maneira como a ativação das subunidades é responsável pela via PI3K e a intensidade dela. Quando há ligação entre um ligante e um receptor (RTK, EGFR, FGFR ou IGF1R) localizado na membrana plasmática da célula, a classe IA se torna ativa, podendo gerar diversas repercussões na célula e em seu metabolismo por meio da ativação do AKT, que regula processos envolvidos na sobrevivência e na progressão do ciclo celular (PORTA *et al.*, 2014). Outra informação relevante é que a sinalização de PI3Ks pode promover a produção de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de NF- κ B e a mediação de secreção de IL-6 em respostas imunológicas por estimulação de CD80/CD86 em células dendríticas (KOORELLA *et al.*, 2014).

1.5 Fosfatidilinositol 3-Quinase delta (PI3K δ)

A Fosfatidilinositol 3-Quinase delta (PI3K δ), também chamada de p110 δ , é uma enzima codificada pelo gene PIK3CD (VANHAESEBROECK *et al.*, 1997), responsável pela regulação das funções imunológicas, principalmente expressa em leucócitos, associada a processos inflamatórios, autoimunidade e rejeição de transplantes (HARRIS *et al.*, 2009).

A isoforma PI3K δ apresenta importantes funções ligadas a imunidade inata, contribuindo para a ativação de neutrófilos e macrófagos acarretando a secreção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e proteases ligadas a sinalização de proteína tirosina quinase. Além disso, apresenta um papel regulatório na imunidade adaptativa. Acredita-se que o papel principal da PI3K δ é prestar ajuda às células Th, onde a sua ausência possa suprimir a função Treg associada também a uma redução na ativação das células B foliculares (HAWKINS & STEPHENS, 2015). A PI3K δ também pode realizar a mediação entre a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a secreção de IL-10, limitando a inflamação e protegendo ratos de choque endotóxico induzido por LPS (AKSOY *et al.*, 2014), sendo um promissor alvo terapêutico em doenças que apresentam resposta pró-inflamatória desregulada.

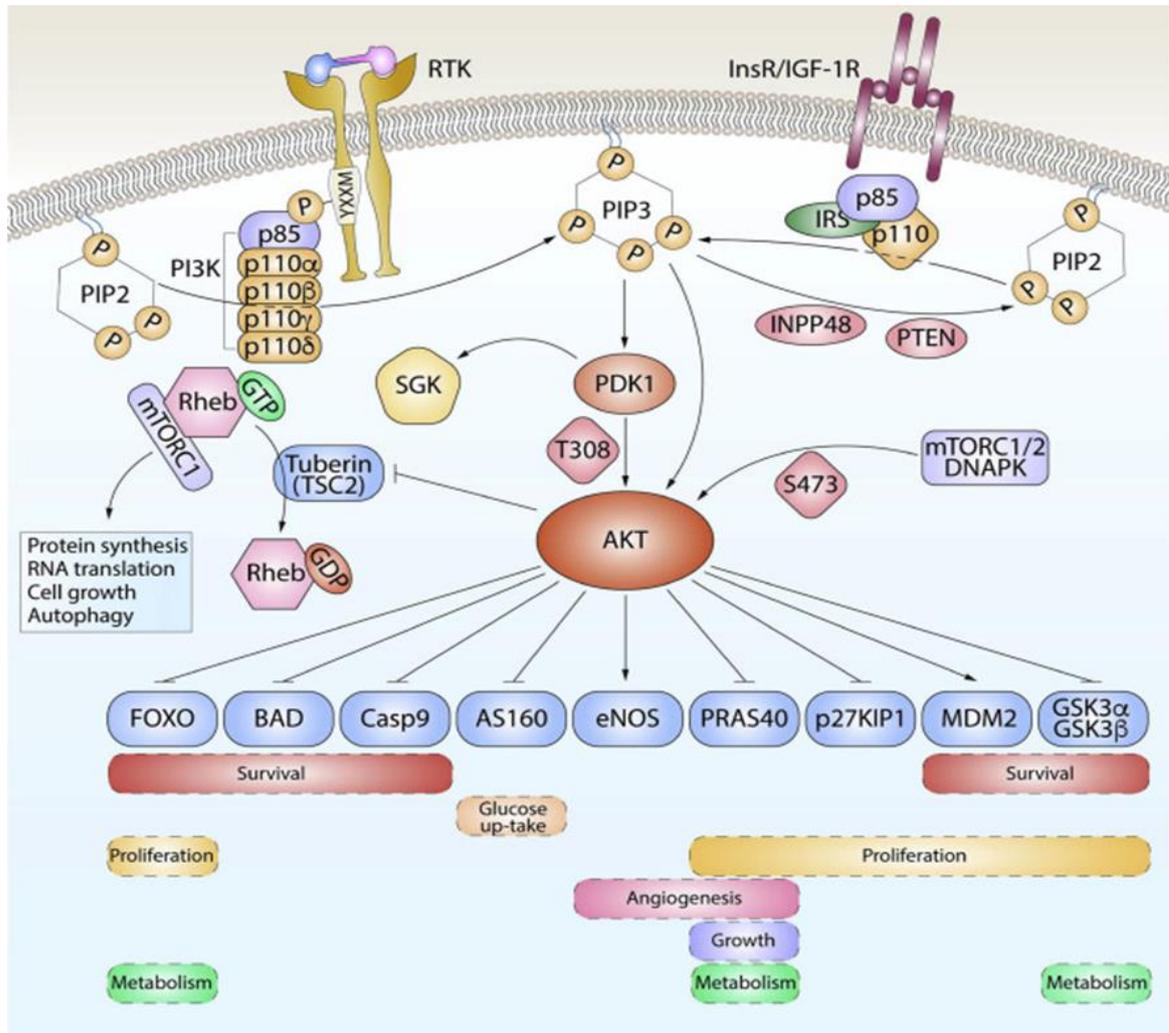
Em vista que a PI3K δ tem um papel significativo na regulação da sobrevivência e proliferação de células B maduras e também para a diferenciação e função de células T efectoras e células Treg (STARK *et al.*, 2015) orientou o desenvolvimento de seus inibidores seletivos, como exemplo temos o Idelalisibe (também conhecido como CAL-101 ou GS-1101), usado para o tratamento de LLC e Linfoma não-Hodgkin (FRUMAN & CANTLEY, 2014). Outro exemplo é o Alpelisibe, recentemente aprovado pela ANVISA e liberado para ser usado contra o câncer de mama avançado ou metastático (ONCONEWS, 2020).

PI3K δ e PI3K γ são amplamente estudadas como potenciais e promissores alvos no tratamento anti-inflamatório e antitumoral, visando o uso terapêuticos de mais tipos de inibidores, associados entre si ou em uso solo, pois a inibição genética ou farmacológica da PI3K δ influencia no microambiente tumoral, podendo reduzir a carga tumoral e as metástases em vários modelos de câncer em camundongos, podendo ser usado diretamente na inibição do crescimento de células tumorais e também no melhoramento da resposta imune antitumoral (STARK *et al.*, 2015).

Essa informação se confirma pela forte relação da via PI3K/Akt/mTOR (**Figura 7**) com o desenvolvimento de tumores sendo um regulador chave na sobrevivência durante o estresse celular (FRUMAN & ROMMEL, 2012). Essa via é ativada através de ligações de fatores de crescimento com a membrana plasmática celular por meio de receptores de tirosina quinases presentes na mesma. Essa ligação gera uma cascata de sinalização intracelular iniciada pela ativação da PI3K, que através do PIP3, ativa Akt (ENGELMAN, 2009). Quando a Akt é fosforilada, ela pode ativar o mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), que tem função regulatória na proliferação celular por fosforilação na transição entre a fase G1 e a S do ciclo celular. Essa reação é também regulada pela desfosforilação do PTEN (FAIVRE; KROEMER; RAYMOND, 2006; YUAN; CANTLEY, 2008). Nesse processo, a perda do PTEN resulta na estimulação da via PI3K, promovendo a sobrevivência da célula e o crescimento tumoral (COURTNEY *et al.*, 2010).

Quando o PTEN sofre inativação, ocorre o aumento da regulação de Akt por meio da PI3K, o que resulta na redução apoptótica, levando a sobrevivência e proliferação celular. Esse processo favorece a tumorigênese e o desenvolvimento do câncer (ANGADI; KRISHNAPILLAI, 2012; YANG, J. *et al.*, 2019).

Figura 6 – Via PI3K/Akt/mTOR.



A via PI3K/Akt consiste na fosforilação da PIP3 através das enzimas PI3K. A PIP3 fosforilada ativa a Akt, que ao interagir com o mTOR, ativa ações celulares como a sobrevivência celular, proliferação, angiogênese, crescimento e metabolismo celular. Imagem e Fonte: O'DONNELL et al., 2018

A partir do estudo dessa via, pode-se melhorar a resposta clínica dos pacientes que fazem o uso desses inibidores, apesar que essas respostas também podem depender da dieta, do metabolismo e do controle de insulina e glicose desses pacientes (GONÇALVES *et al.*, 2018).

No contexto do câncer colorretal, o papel da PI3K ainda não está claramente definido, porém estudos já comprovaram a presença de mutações no gene PIK3CA, o mesmo que codifica a subunidade p110, na análise tecidual de pólipos colorretais e

no próprio CCR. Acredita-se que esses achados são provenientes dos eventos primários da tumorigênese do CCR. Também foram achadas mutações no PIK3CA em pacientes com CCR tanto em estágios iniciais como em quadros mais avançados e até mesmo de metástases, principalmente ligados a alterações nos éxons 9 e 20, associados à resistência aos tratamentos anti-EGFR (PAPADATOS-PASTOS *et al.*, 2015).

Outro trabalho que também pode demonstrar a estreita relação do trato gastrointestinal com a PI3K é o estudo de Steinbach *et al* (2015), que estuda a inativação da PI3K δ na regulação das células Th1/Th17 no desenvolvimento de colite microbiota-dependente. Esse estudo mostra que a PI3K δ regula a produção de IL-10 e IL-12 em resposta ao PAMPs, assim demonstrando um perfil anti-inflamatório, apresentando melhora nos escores histológicos apresentados, mostrando redução no dano tecidual dos camundongos que não tiveram a PI3K δ silenciada.

1.6 Justificativa

O câncer, que apresenta altas taxas de incidência, prevalência e mortalidade, é uma problemática persistente e importante a ser estudada, principalmente quando colocamos sob foco os efeitos adversos dos tratamentos administrados nos pacientes oncológicos.

Ainda são insatisfatórios e/ou incompletos os estudos relacionados a patogênese de algumas das reações adversas causadas pelos agentes quimioterápicos, o que pode resultar na redução das opções terapêuticas usadas no tratamento e na interrupção ou adiamento do tratamento, podendo comprometer o sucesso e a eficácia do tratamento (BOSSI *et al.*, 2015).

Reações como o comprometimento gastrointestinal devido a toxicidades relacionadas ao tratamento são causas bastante comuns para a recusa do tratamento e até mesmo a redução da adesão ao mesmo por parte dos pacientes, o que causa um impacto econômico anual de 100 a 330 bilhões de dólares, somente nos Estados Unidos (BOSSI *et al.*, 2015). No Brasil, ainda não temos os dados demográficos e econômicos ao certo, porém segundo o artigo de Aguiar *et al.* (2018), os custos das intervenções em pacientes oncológicos devido a reações adversas ultrapassam a prescrição farmacêutica, muitas vezes exigem internação em unidades de terapia intensiva e tratamentos prolongados, aumentando assim o custo por cada paciente. Sabendo que o paciente oncológico em tratamento é passível de apresentar os sintomas de efeitos colaterais, o estudo da patogênese desses efeitos é de extrema importância para a pesquisa, para que posteriormente seja possível formular meios mais efetivos de reduzir ou extinguir os malefícios causados aos pacientes em tratamento.

Dentre os pacientes diagnosticados com câncer colorretal, um dos efeitos colaterais mais comuns e mais graves é a mucosite intestinal proveniente do uso do fármaco irinotecano no tratamento quimioterápico, que mesmo tendo sido alvo de estudos na última década, muito ainda tem para se elucidar sobre o assunto, no objetivo de reduzir cada vez mais esse tipo de intercorrência diante do tratamento antitumoral. De forma geral, cerca de 40% dos pacientes que recebem quimioterapia antineoplásica em doses padrão, apresentam algum grau de mucosite (GIBSON *et al.*, 2013).

Estudos genéticos e farmacológicos têm descrito a PI3K γ e a PI3K δ como reguladoras da imunidade inata e adaptativa, respectivamente, mas um certo grau de redundância pode ser observado (GHIGO *et al.*, 2010). Sabendo que a isoforma P110 δ é expressa em células imunológicas e apresentam uma variedade de funções no sistema imune adaptativo, principalmente ligadas as células T e macrófagos (VANHAESEBROECK *et al.*, 2016), e sua importância na via de regulação e crescimento tumoral, como já foi exposto neste trabalho, é relevante definir melhor o efeito da isoforma delta de PI3K em contextos inflamatórios diversos e como ocorre sua regulação. Nesse sentido, apesar de a mucosite intestinal ser uma condição inflamatória bem elucidada, o envolvimento de PI3K delta na orquestração da resposta imunológica e inflamatória ainda é pouco conhecido.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Estudar o papel do PI3K delta na Mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano.

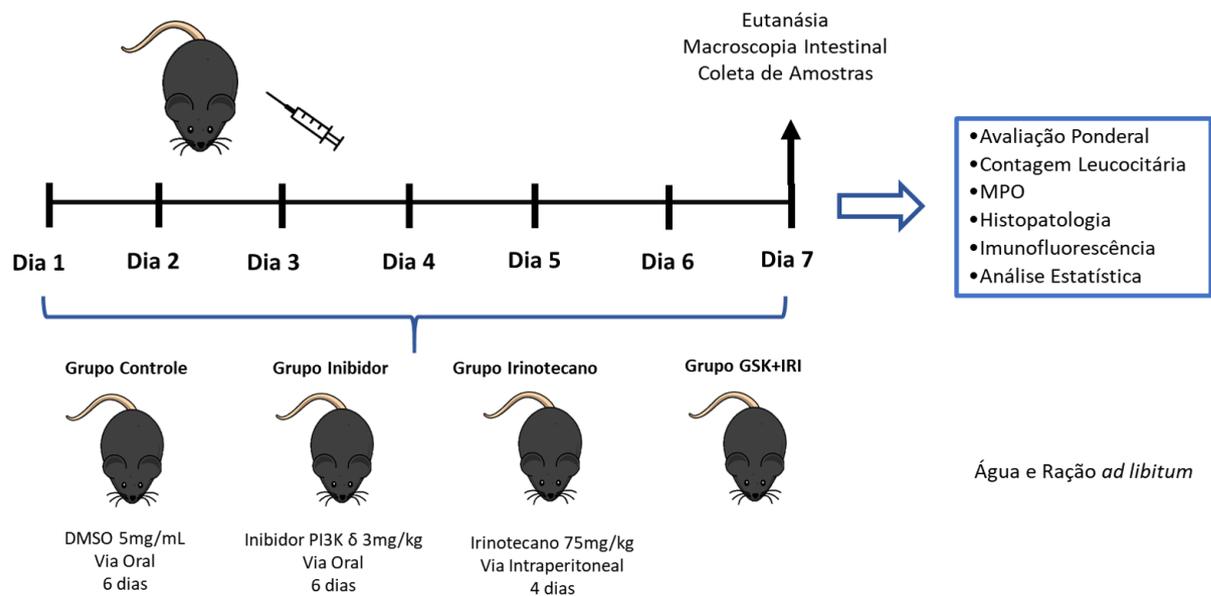
2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a mucosite intestinal induzida pelo irinotecano através da mielotoxicidade, da avaliação ponderal e do grau de diarreia.
- Avaliar a inibição da via PI3K delta agrava nas alterações histopatológicas no modelo experimental de mucosite induzida pela irinotecano em camundongos C57BL/6.
- Mensurar o estresse oxidativo na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano e administrados com inibidor de PI3K delta.
- Avaliar a expressão proteica de fosfo-AKT, FOXP-3 e F4/80 após a modulação farmacológica com o inibidor de PI3K delta na mucosite induzida pelo irinotecano

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fluxograma de Atividades

Figura 7 - Fluxograma de indução do modelo e administração do inibidor de PI3K δ com as dosagens realizadas durante a pesquisa.



Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1x/dia/6 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). O grupo GSK+IRI recebeu o inibidor (GSK) combinado ao Irinotecano com suas respectivas doses e nos seus respectivos períodos. Avaliação ponderal e da consistência das fezes dos animais foram feitas diariamente. Os camundongos foram eutanasiados no sétimo dia e coletadas as amostras de intestino (íleo, duodeno e jejuno), fígado e cólon para avaliação da resposta inflamatória, histopatológica e estresse oxidativo. No ato da eutanásia, foram avaliados os escores de edema e hiperemia do intestino dos animais.

3.2 Aspectos Éticos

Todos os protocolos experimentais que envolveram o uso de animais seguiram as Recomendações Éticas em Pesquisa Animal para apreciação pela comissão de ética da Universidade Federal do Ceará e antes do início da execução dos mesmos, o presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa animal da UFC, protocolado sob o CEUA N° 5132240718 (**Anexo 1**).

Conforme caracterizado nesse projeto, prezamos pelo uso mínimo de animais por procedimento, evitando-se o ferimento ao preconizado na legislação vigente. Ainda, de acordo com a legislação vigente, o projeto contou com o refinamento necessário aos ensaios, incluindo o uso adequado de doses de anestésicos, analgesia e eutanásia. Essas abordagens recaem e estão fundamentadas sobre o que preconiza a legislação, acerca dos 3 R's.

Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) + xilasina (10 mg/kg, i.p.) a coleta sanguínea foi feita através do plexo retro orbital e, quanto a eutanásia, esse procedimento foi seguido por exsanguinação por corte da artéria carótida, conforme preconiza a legislação vigente. Nos experimentos, foram utilizados no total 65 animais C57BL/6.

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, pesando entre 20-24 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos sob iluminação: Ciclo claro/Escuro 12h/12h; Alimentação: ração padrão para roedores Nuvilab CR-1 irradiada-Quimtia; Fonte de água: filtrada potável; Exaustão do ar: estante ventilada/exaustor; em gaiolas de polipropileno (dimensões 16x34x41 cm), oriundos do Biotério Setorial do Campus Porangabuçu - Prof. Eduardo Augusto Torres da Silva da Universidade Federal do Ceará, onde foram mantidos até o final do experimento.

3.4 Drogas

Usamos o Irinotecano (Evoterin®, ampolas 100 mg/5mL, da empresa Evolabis. GSK2269557 (inibidor de PI3K-delta, 3 mg/kg via oral) foi obtido da empresa Selleckchem Inc, Germany.

3.5 Modelo de Mucosite Intestinal induzida pelo irinotecano.

A mucosite foi induzida de acordo com protocolo desenvolvido por Ikuno *et al.* em 1995 e adaptado por MELO *et al.* (2008) e por LIMA-JÚNIOR *et al.* (2012) no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer. Os camundongos receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de solução veículo (DMSO 0,5%, 5 mL/kg, i.p.) ou Irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) administrados uma vez ao dia durante quatro dias consecutivos, realizando as aplicações sempre no mesmo horário. A eutanásia dos animais foi realizada no 7º dia do experimento após a primeira aplicação dos quimioterápicos, realizada no dia 1 (**Figura 7**).

3.6 Grupos experimentais e Avaliação dos Parâmetros Gerais da Indução da Mucosite

3.6.1 Grupos Experimentais:

Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos (n = 6-8/grupo): Grupo A: Controle negativo, solução veículo (Dimetil sulfóxido, DMSO 0,5%, 5 mL / kg, i.p.) administrados durante seis dias. O grupo Controle recebeu esse veículo pois o inibidor GSK2269557 foi solubilizado em DMSO. Tanto o DMSO quanto a solução do inibidor foram posteriormente diluídas em solução salina para atingir suas concentrações ideais para

este estudo, conforme descrevemos. Grupo B: Irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) administrados uma vez ao dia durante quatro dias consecutivos. Grupo C: GSK2269557 (inibidor de PI3K-delta, 3 mg/kg via oral) administrados uma vez ao dia durante seis dias consecutivos. Grupo D: Grupo GSK+Iri que recebeu Irinotecano (75mg/Kg, i.p) por quatro dias e GSK (3mg/kg, via oral) por seis dias consecutivos. A escolha da dose do inibidor foi utilizando como referência resultados de DOWN *et al.* (2015).

3.6.2 Parâmetros gerais de mucosite:

a) *Avaliação Ponderal*: Os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em % de ganho de peso.

b) *Contagem de Leucócitos totais*: A contagem total de leucócitos teve como objetivo verificar o efeito da quimioterapia à base de irinotecano na indução da leucopenia. Essa observação nos auxiliou como controle da atividade citotóxica do fármaco sobre o animal. Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, i.p.) + xilasina (10 mg/kg, i.p.). A contagem foi realizada através da Câmara de Neubauer com amostra corada com solução de Turk. Os resultados foram expressos como n° células/mm³.

c) *Análise histopatológica e Morfometria do Intestino*: Após a eutanásia dos animais, foi removido um segmento de 0,5 cm do íleo de cada animal. Em seguida, as amostras foram fixadas em formol tamponado 10% e processadas para coloração pelo método HE (Hematoxilina-Eosina) para exame em microscopia óptica 100x (Microscópio Nikon com objetiva 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x). A análise histopatológica observou aspecto dos vilos e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório. O grau e a severidade da lesão intestinal foram determinados de acordo com o sistema de escores proposto por Macpherson e Pfeiffer (1978) e descritos no **Quadro 3**.

Quadro 3 – Escores para avaliação de achados microscópicos de Macpherson e Pfeiffer (1978).

| Escores | Achados Microscópicos de Macpherson e Pfeiffer (1978) |
|---------|--|
| 0 | Achados histológicos normais |
| 1 | Vilosidades encurtadas, perda da arquitetura das criptas, infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. |
| 2 | Vilosidades encurtadas com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. |
| 3 | Vilosidades encurtadas com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema. Muscular com edema, vacuolização e infiltrado neutrofilico. |

Para análise morfométrica, priorizamos obter a medida das vilosidades, considerada desde o ponto de encontro entre dois vilos até o topo do vilos em questão (altura da vilosidade), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre dois vilos medidos até o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade absorviva (razão altura das vilosidades/profundidade das criptas) e também o cálculo da área do vilos. A razão entre o comprimento das vilosidades intestinais e das criptas de Lieberkühn foi calculada em μm utilizando-se o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilosidades e criptas por corte histológico.

d) *Ensaio de mieloperoxidase (MPO)*: A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino de camundongos após a indução da mucosite foi determinada pelo ensaio de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado. Uma porção de intestino foi coletada e incubada em 200 μL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado

a 3.000 rpm/15 min/4°C. Nesse processo, também foi realizado um choque hipotônico no sedimento celular (pellet) com 1000 µl de NaCl 0,2%. Após uma nova centrifugação a 3000 rpm/15 min/4°C, o “pellet” foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e foi novamente homogeneizado. Ainda nesse processo, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm/15 min/4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante do intestino foi colocado em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, foram adicionados 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. Após esse passo, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M. Foi realizada a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1x10⁵ neutrófilos). A absorbância foi determinada em um leitor de placas no comprimento de onda de 450 nm (Alves-Filho et al., 2006). Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido.

3.7 Estresse Oxidativo

A análise de estresse oxidativo se deu pela avaliação da peroxidação lipídica e a quantificação de dialdeído malônico (MDA). O dialdeído malônico (MDA) é o metabólito final da peroxidação dos lipídeos que expressa indiretamente a ação dos radicais livres no soro, servindo na avaliação do estresse oxidativo. Essa técnica teve como objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA) formado na peroxidação lipídica. O procedimento aconteceu através da extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido (ácido tiobarbitúrico), originando um composto de cor

rosa. A concentração de MDA pode ser expressa por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

As amostras de intestino foram lavadas com soro fisiológico gelado (4° C) para remover quaisquer vestígios de sangue, pesadas e estocadas a -80°C imediatamente após a coleta. Posteriormente, a amostra foi triturada e homogeneizada em KCl gelado 1,15%, resultando em um homogenato a 10%. Foi retirado 250µL de cada amostra do homogenato e colocado em banho-maria por 1 hora a 37°C. Após o banho, acrescentou-se 400µL de ácido perclórico 35% nas amostras e centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em microtubos de tampa rosqueada, foram colocados 600µL do sobrenadante e adicionado 200µL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Os microtubos foram colocados em um banho-maria por 30 minutos a 95-100°C. A leitura foi feita pelo aparelho ASYS UVM 340® (Biochrom Ltd.), em placas de Elisa, com absorvância de 532nm.

3.8 Imunofluorescência

Para a realização da imunofluorescência, os cortes dos tecidos foram fixados em metanol (Vetec Química Fina Ltda., Duque de Caxias, RJ, Brasil) durante 2 minutos. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0), à temperatura de 95 °C, por 15 minutos, seguida de resfriamento, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Depois, foram feitos a permeabilização da membrana nuclear, por 10 minutos, utilizando triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), e o bloqueio de ligações inespecíficas, utilizando glicina 0,3 M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em albumina sérica bovina (BSA) 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA), durante 30 minutos. Os tecidos foram incubados com os anticorpos primários feitos em coelho Fosfo-Akt Ser473 XP® Rabbit mAb #4060

(Cell Signaling® Technology Inc., Danvers, MA, EUA) na diluição de 1:400, F4/80 D2S9R XP® Rabbit mAb #70076 (Cell Signaling® Technology Inc., Danvers, MA, EUA) e FOXP3 NB600-245 (Novus Biologicals USA, Littleton, CO, EUA) ambos na diluição de 1:300, durante a noite, na temperatura de 2 – 8 °C. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário feito em cabra anti-igG de coelho Donkey anti-Rabbit Alexa Fluor 568 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), na proporção de 1: 400 e 1:300 (no caso das amostras F4/80 e FOXP3), durante 1 hora e 30 minutos. Com a finalidade de marcar os núcleos celulares, as seções dos tecidos foram incubadas, durante 30 minutos, com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (4 µL em 200 mL de PBS). Para montagem das lâminas, foi utilizado o meio Prolong Gold Antifade Mountant (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para a aquisição das fotomicrografias, foi utilizado o Cytation da Biotech.

As fotomicrografias foram analisadas através de um “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA). Para realizar a quantificação da área fluorescente nas fotomicrografias, foi necessário fazer a diferenciação dos pixels fluorescentes pela maior saturação de cor relacionada à fluorescência (vermelha). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem, que foi calculada comparando a fluorescência positiva dos anticorpos com a fluorescência do DAPI (100%).

3.9 Análise Estatística

A análise estatística, utilizando o software GraphPad Prism® versão 6.01, foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis

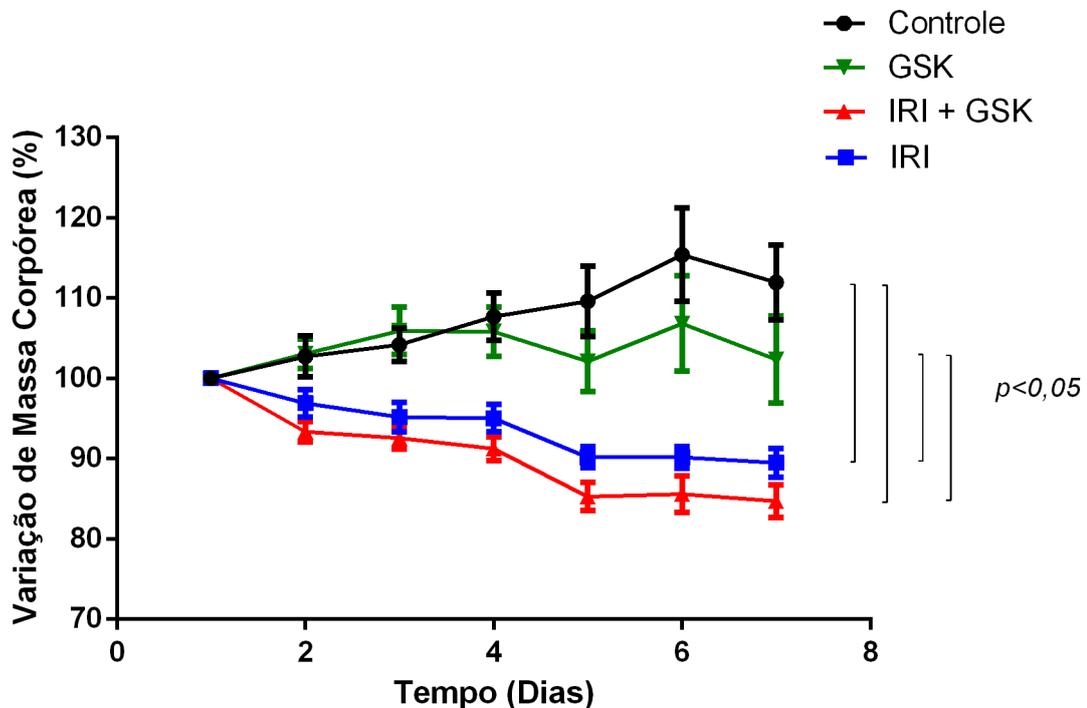
conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos, seguidos do teste de comparações múltiplas de Bonferoni ou teste de Dunn, baseando-se na continuidade das variáveis em análise. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 O inibidor de PI3K delta associado ao Irinotecano potencializa a perda de massa corpórea em camundongos

Durante os 7 dias de experimento, foi observado um decréscimo de 20% da massa corpórea dos animais administrado com o irinotecano quando comparado ao grupo Controle Negativo de forma significativa ($p < 0,05$), como já era esperado de acordo com o modelo experimental executado. Também houve uma redução de peso não significativa (9%) na comparação entre os grupos Controle e GSK (que recebeu apenas o inibidor de PI3K δ). Observamos também perda de peso no grupo GSK+Iri (Irinotecano + Inibidor de PI3K δ), que apresentou um decréscimo de 27% em relação ao grupo Controle (veículo), e de 17% em relação ao grupo GSK (inibidor) como mostrado na **Figura 8**. A diferença de peso também foi significativa entre os grupos Irinotecano e GSK, que apresentaram uma diferença ponderal de 12% entre eles. Não houve significância estatística entre os 2 grupos de estudo que receberam irinotecano. Esse resultado evidencia a perda ponderal como um dos efeitos colaterais do irinotecano, não do inibidor, em vista que não apresentou perda de peso quando administrado isoladamente. Porém esse estudo também mostra que a administração conjugada do inibidor de PI3K δ com o quimioterápico agrava a perda de peso do animal.

Figura 8 – Variação de Massa Corpórea dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3K δ



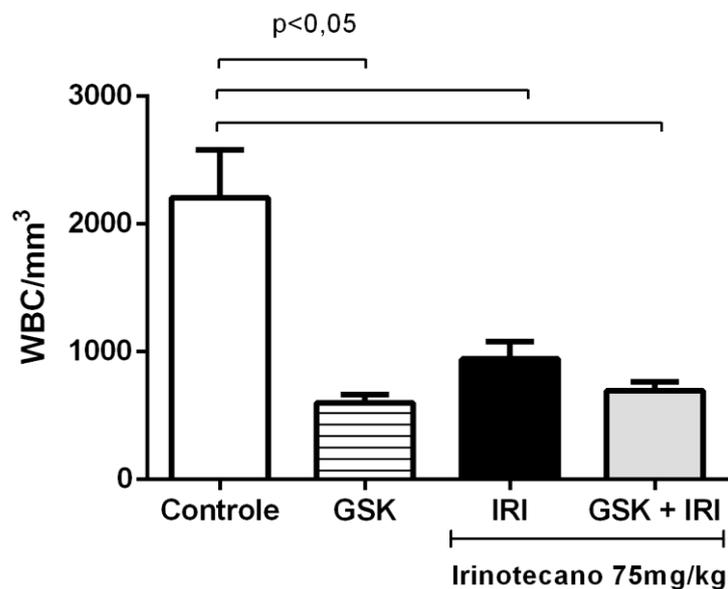
Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), Irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias) e Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Irinotecano aumenta a perda de massa corpórea em função do tempo, comparado aos animais tratados com veículo e somente com inibidor. O inibidor de PI3K delta agrava a perda induzida pelo irinotecano de forma significativa ($p < 0,05$). Os pontos representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média) do percentual de variação da massa corporal em relação ao peso inicial. Para a análise estatística utilizou-se o teste Two-way ANOVA. N = 65 animais.

4.2 O Inibidor de PI3K delta não interfere na leucopenia em camundongos

Na **Figura 9** evidencia-se a contagem de leucócitos totais como um parâmetro de citotoxicidade e indução do modelo experimental. De acordo com a contagem de leucócitos dos animais testados, houve significância estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os demais grupos, porém não houve diferença significativa entre os grupos Irinotecano, GSK (Inibidor de PI3K δ) e GSK+Iri (Irinotecano + Inibidor). A variância entre os grupos deu-se de mais de 1000 leucócitos por mm³ sanguíneo. A **figura 9**

mostra a leucopenia como um dos principais efeitos adversos associados ao quimioterápico e ao inibidor separadamente. Na combinação dos dois compostos, não podemos afirmar que o inibidor agravaria a leucopenia, pois não há significância estatística com os outros grupos.

Figura 9 – Contagem de Leucócitos Totais (WBC, *White Blood Cell*) dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3K δ

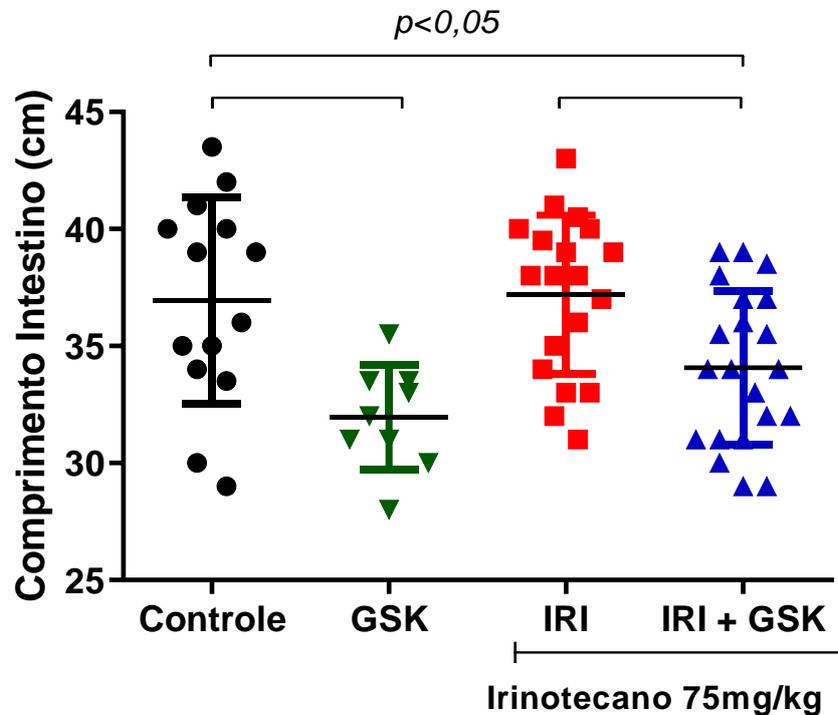


Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1x dia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1x dia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de sangue foi coletada do plexo retro orbital, e em seguida foi realizada a contagem do número total de Leucócitos. A figura apresenta o efeito do irinotecano em diminuir o número total de leucócitos circulantes, verificou-se a leucopenia no 7º dia após a aplicação do antineoplásico e do inibidor de PI3K delta ($p < 0,05$). Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 65 animais.

4.3 O uso do Inibidor de PI3K delta sozinho e associado ao irinotecano reduz o comprimento intestinal e promove alterações no intestino delgado.

A **Figura 10** apresenta a avaliação macroscópica feita durante a eutanásia dos camundongos, onde foi realizada a medição do comprimento intestinal total. O grupo Irinotecano não alterou o comprimento do intestino quando comparado com o Controle Negativo. Por sua vez, o grupo GSK isoladamente apresentou uma diminuição de 6 cm na média do comprimento intestinal dos animais, em relação ao grupo Controle que teve média de comprimento intestinal de 37 cm, apresentando significância estatística ($p < 0,05$) quando comparados os dois grupos (**Figura 10**). O grupo Irinotecano também apresentou média de comprimento intestinal igual a 37cm, não havendo diferença estatística quando comparado com o grupo Controle. O grupo GSK+Iri apresentou média de 34 cm, apresentando significância estatística na comparação com os grupos Controle e Irinotecano. Os resultados dessa avaliação demonstram que o inibidor de PI3K δ reduz a média do comprimento intestinal de camundongos administrados com Irinotecano e quando administrado separadamente, o que seria um dos parâmetros anatômicos de toxicidade do fármaco não foram evidenciados nesse estudo.

Figura 10 – Medição de comprimento intestinal dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3Kδ



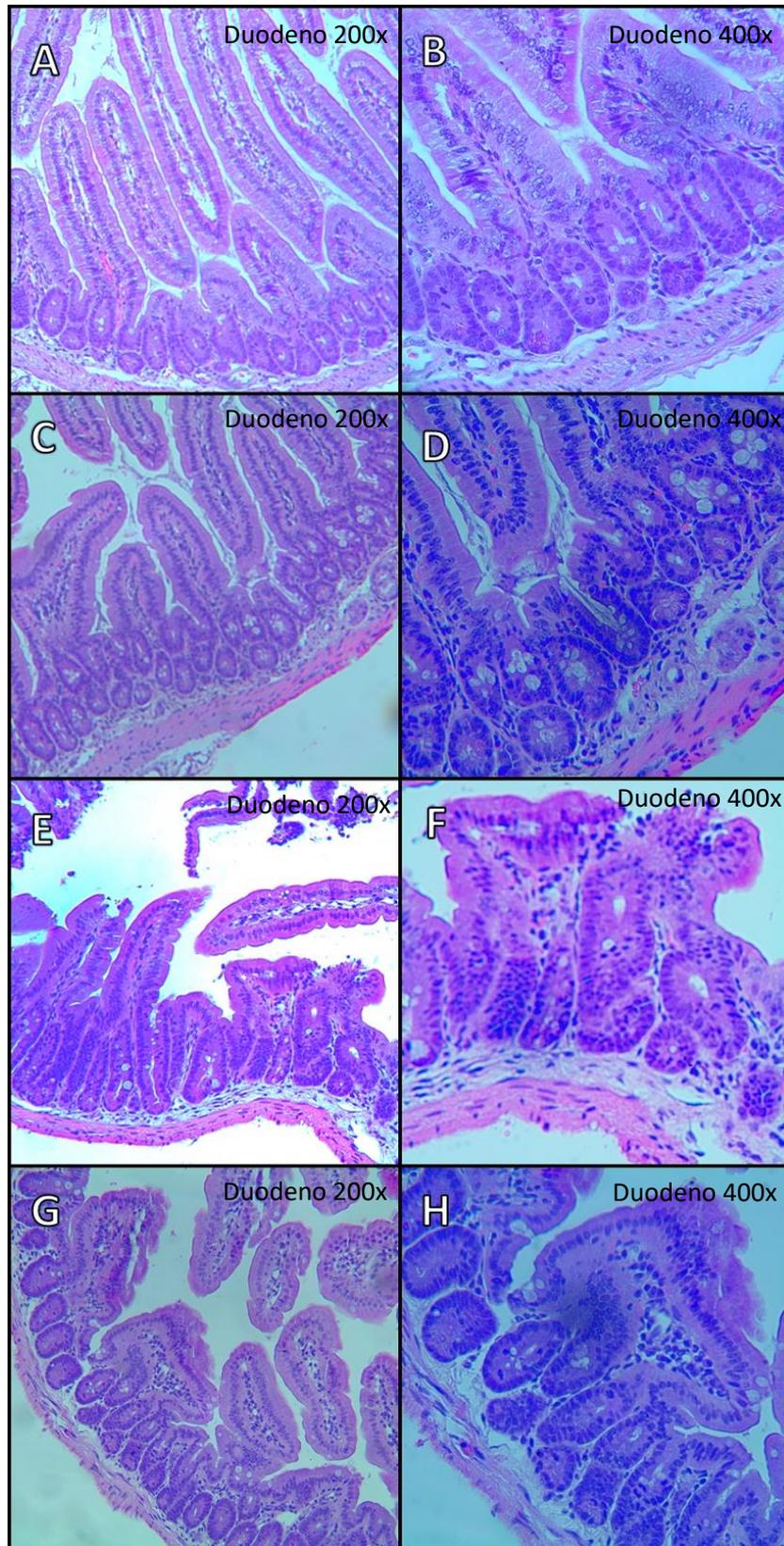
Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino delgado foi coletada e medida o comprimento. A figura apresenta o efeito do inibidor de PI3K delta + irinotecano em diminuir o comprimento ($P < 0,05$). Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 65 animais.

Histologicamente, no grupo Controle Negativo (DMSO), podemos observar um epitélio colunar simples normal, apresentando vilosidades e criptas na sua proporção normal, células caliciformes e glândulas de Lieberkühn. As camadas submucosa, muscular e serosa estão dentro da normalidade. O grupo Irinotecano apresentou uma histologia clássica da mucosite induzida pelo fármaco. Houve redução de altura e tumefação dos vilos, associada a perda de arquitetura das criptas e há um infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria do tecido no duodeno (**Figura 11**), jejuno (**Figura 12**) e íleo (**Figura 13**). O grupo GSK, que recebeu apenas o inibidor,

apresentou nos três tecidos deformidade no formato e na espessura do vilo e um infiltrado leucocitário sugestivo do uso de inibidor de PI3K.

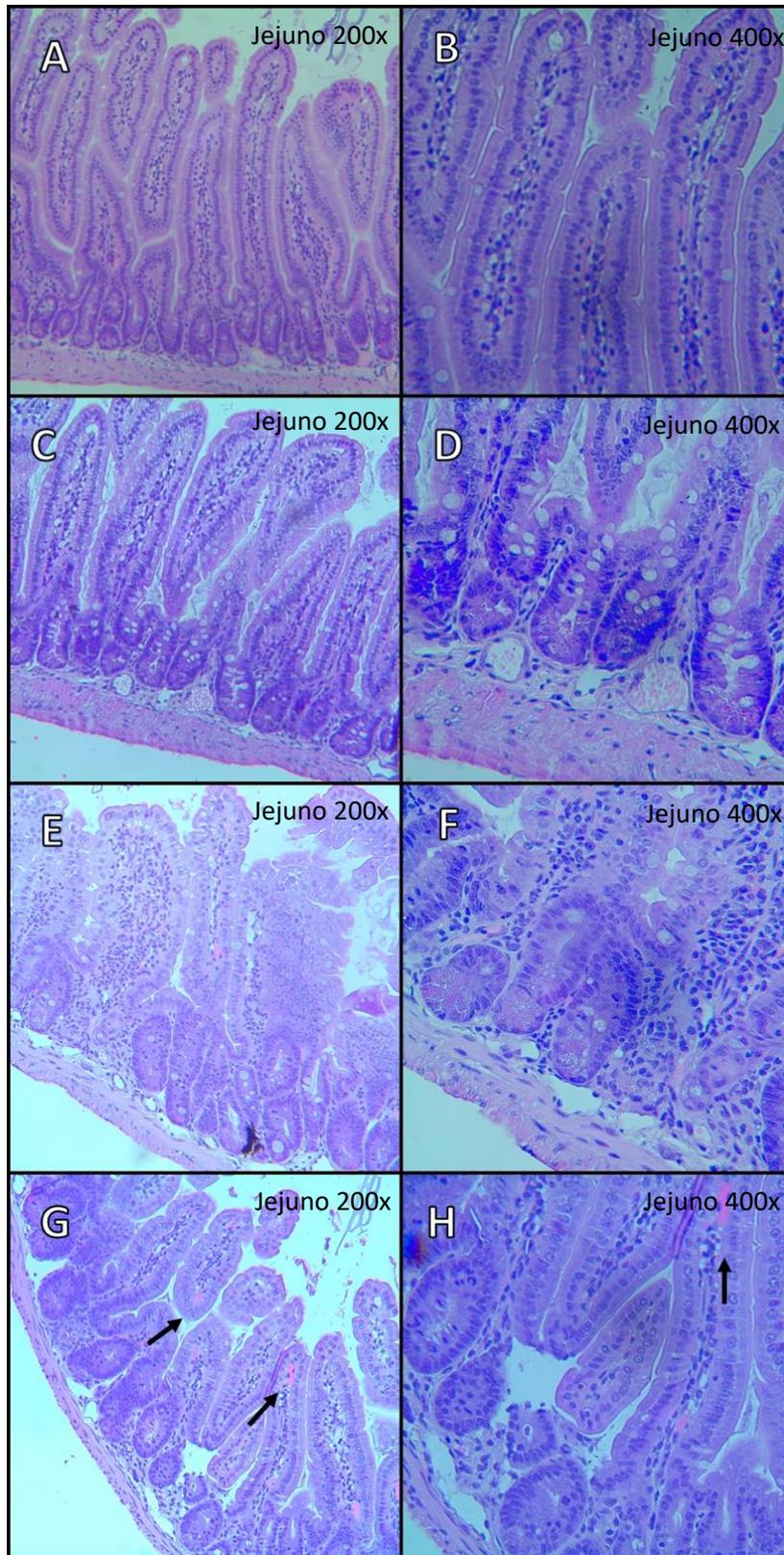
No jejuno e no íleo, o grupo GSK+Iri apresentou os mesmos eventos do grupo Irinotecano, porém de uma maneira mais exacerbada, mostrando inclusive pontos de hiperemia nos vilos (**Figura 12 e 13**).

FIGURA 11 – Fotomicrografias de amostras de duodeno após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3K δ em camundongos C57BL/6



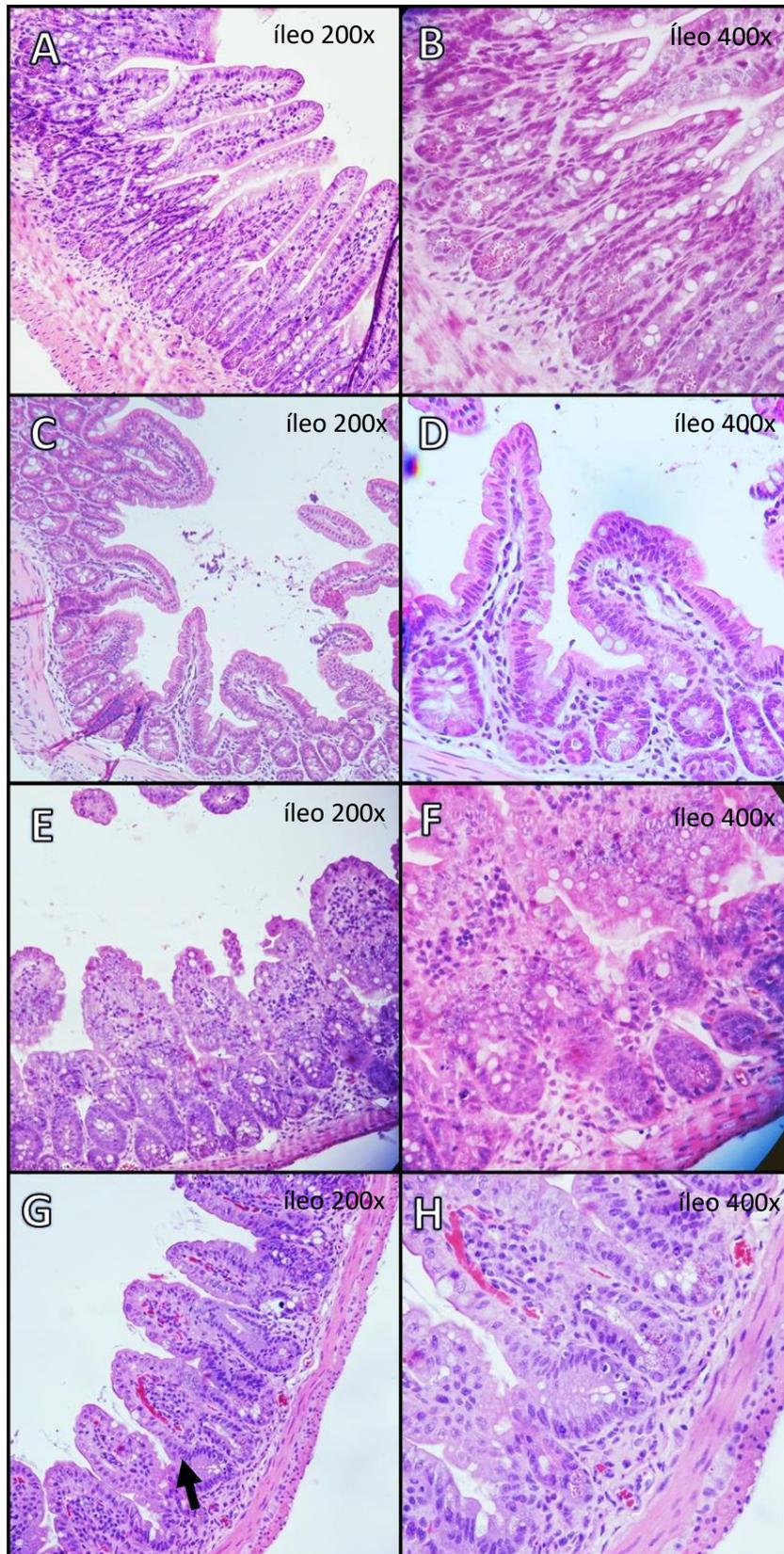
Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias) e/ou Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de duodeno foram coletadas no ato da eutanásia e mantidas em formol para realização da histologia. Imagens A e B (grupo DMSO) mostram o duodeno em sua normalidade histopatológica do órgão. Imagens C e D (grupo GSK) apresentou deformidade no formato e na espessura do vilo e um infiltrado leucocitário sugestivo do uso de inibidor de PI3K. Imagens E e F (grupo Iri) apresentam as características histológicas da mucosite induzida por irinotecano. E as imagens G e H (grupo GSK+Iri manteve a altura reduzida dos vilos, houve um aumento do tamanho das criptas e uma visível migração de leucócitos As imagens A, C, E e G estão no aumento de 200x e das imagens B, D, F e H estão no aumento de 400x. N = 65 animais.

FIGURA 12 – Fotomicrografias de amostras de jejuno após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3K δ em camundongos C57BL/6



Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias) e/ou Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de jejuno foram coletadas no ato da eutanásia e mantidas em formol para realização da histologia. Imagens A e B (grupo DMSO) mostram o jejuno em sua normalidade histopatológica do órgão. Imagens C e D (grupo GSK) apresentou deformidade no formato e na espessura do vilo e um infiltrado leucocitário sugestivo do uso de inibidor de PI3K. Imagens E e F (grupo Iri) apresentam as características histológicas da mucosite induzida por irinotecano. E as imagens G e H (grupo GSK+Iri manteve a altura reduzida dos vilos, houve um aumento do tamanho das criptas, uma visível migração de leucócitos e apresentou pontos de hiperemia. As imagens A, C, E e G estão no aumento de 200x e das imagens B, D, F e H estão no aumento de 400x. N = 65 animais.

FIGURA 13 – Fotomicrografias de amostras de íleo após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3K δ em camundongos C57BL/6

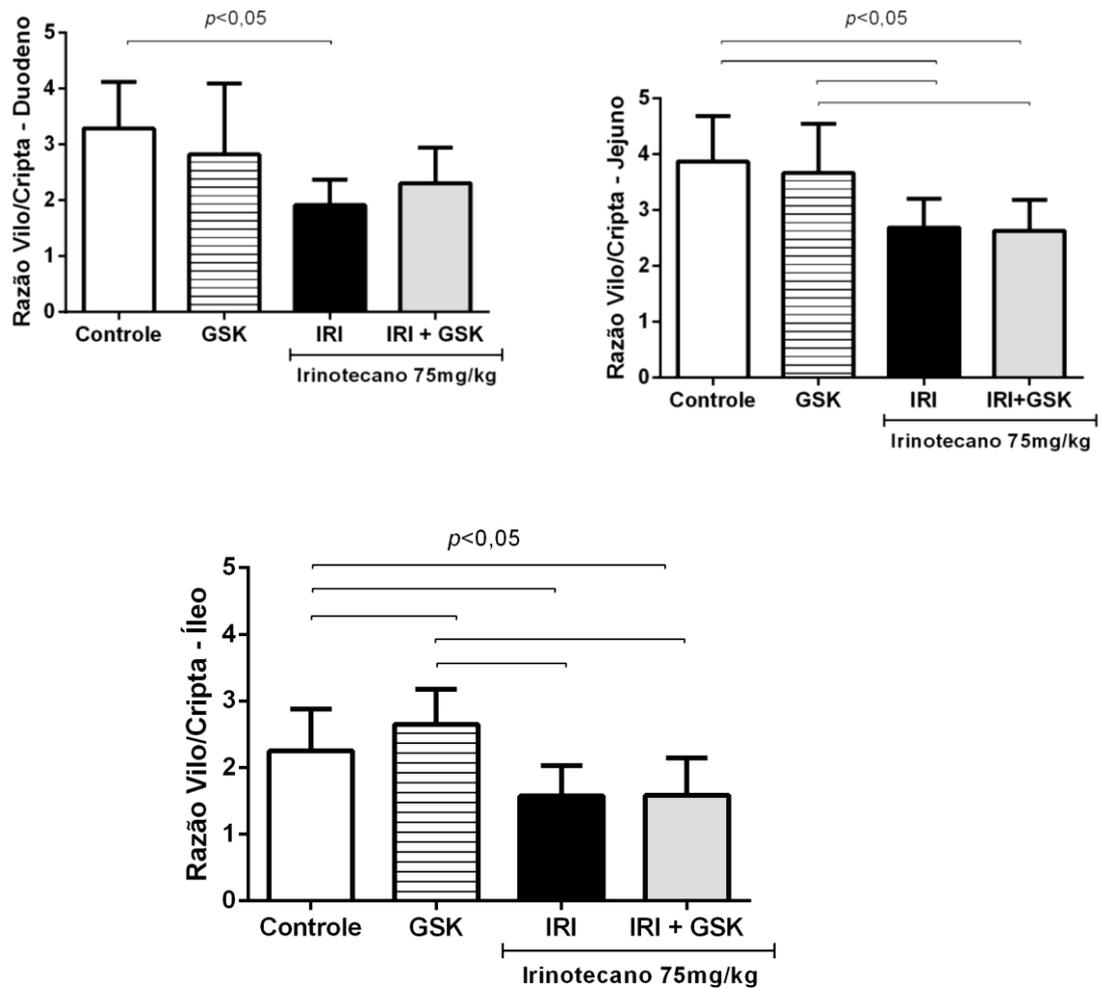


Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias) e/ou Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de íleo foram coletadas no ato da eutanásia e mantidas em formol para realização da histologia. Imagens A e B (grupo DMSO) mostram o íleo em sua normalidade histopatológica. Imagens C e D (grupo GSK) apresentam perda de altura dos vilos e de arquitetura das criptas com infiltrado leucocitário. Imagens E e F (grupo Iri) apresentam as características histológicas da mucosite induzida por irinotecano. E as imagens G e H (grupo GSK+Iri) apresentam as características da mucosite induzida por irinotecano de maneira intensificada com pontos de hiperemia. As imagens A, C, E e G estão no aumento de 200x e das imagens B, D, F e H estão no aumento de 400x. N = 65 animais.

4.4 O uso do inibidor de PI3K delta associado ao Irinotecano altera a morfometria intestinal de camundongos

Houve uma redução na razão vilo/cripta durante as análises das três partes do intestino delgado. No duodeno, houve significância ($p < 0,05$) apenas na comparação dos grupos Controle com Irinotecano, como já era esperado no modelo de mucosite induzida por irinotecano. No jejuno, a comparação entre todos os grupos foi significativa, exceto a comparação entre os dois grupos que tiveram as razões mais altas (Controle e GSK) e os dois grupos que tiveram as razões mais baixas (Irinotecano e GSK+Iri). Na análise do íleo, a comparação de todos os grupos entre si também foi significativa, exceto na comparação dos grupos Irinotecano e GSK+Iri, que tiveram uma diferença de apenas 0,05542 entre as suas razões, conforme apresentado na **Figura 14**.

FIGURA 14 – Análise da razão vilos/crypta em segmentos intestinais após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3Kδ em camundongos C57BL/6

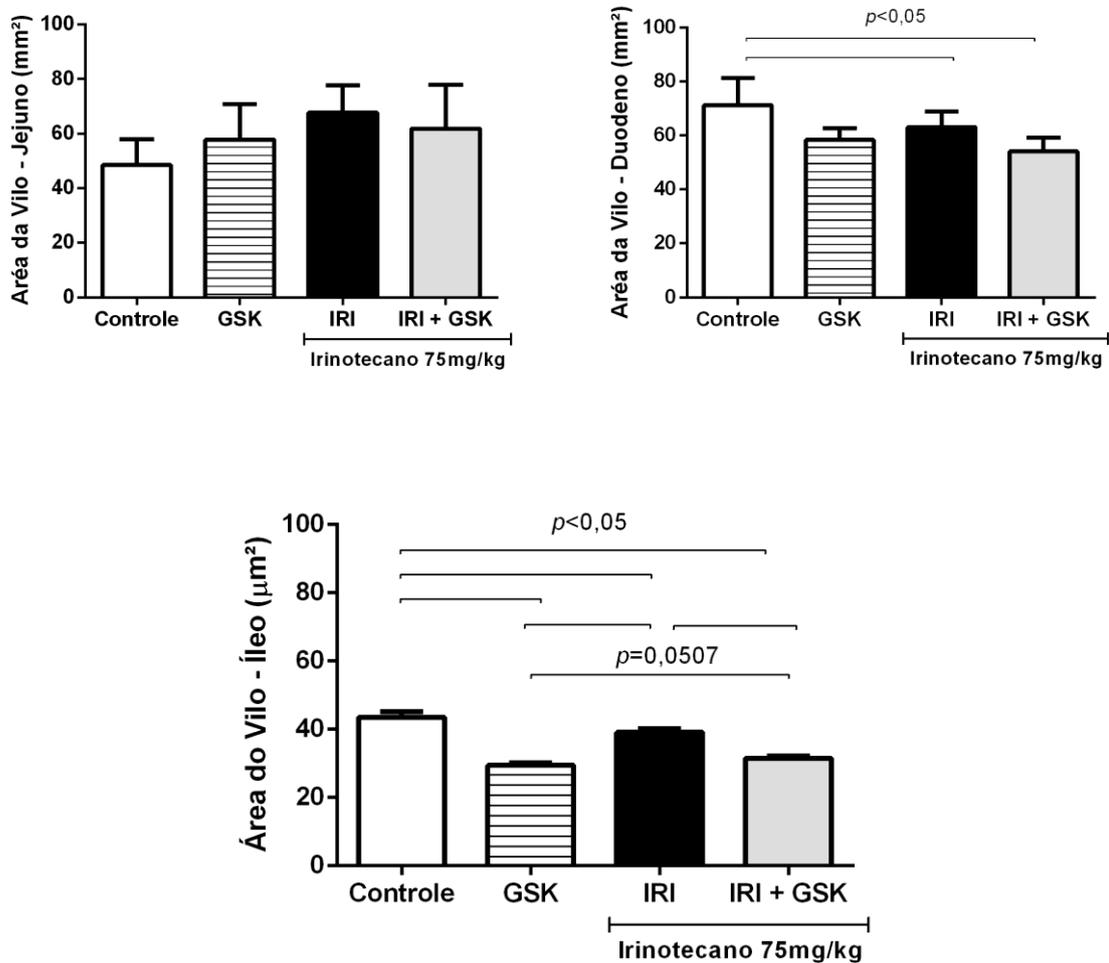


Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), e/ou Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino foi coletada no ato da eutanásia e mantida em formol para realização da histologia. As imagens foram fotografadas em microscópio óptico na objetiva de 20x, e medição das estruturas intestinais feitas pelo ImageJ. Razão entre a altura do vilos e o tamanho da cripta foi diminuída nos grupos que receberam o irinotecano. Essa diminuição foi ainda maior no grupo que recebeu o antineoplásico associado ao inibidor de PI3K delta ($P < 0,05$). Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 65 animais.

Também foi detectado uma redução na área dos vilos intestinais dos animais, como no grupo irinotecano, que apresentou uma redução de mais de $3\mu\text{m}^2$ na média

dos vilos medidos em relação ao grupo Controle. Essa redução de área foi maior ainda na comparação entre os grupos controle e inibidor de PI3K delta, onde a redução foi de mais de $7\mu\text{m}^2$. A área dos vilos também foi um parâmetro analisado no intestino delgado dos camundongos pelo estudo, onde no duodeno encontramos significância estatística ($p < 0,05$) na comparação dos grupos Controle e Irinotecano e dos grupos Controle e GSK+Iri. No jejuno, não houve diferença estatística na comparação entre nenhum dos grupos, onde a área dos vilos, segundo esse estudo, se encontra quase que inalterada na questão estatística, porém visivelmente diferente na comparação dos grupos quando analisado nas imagens da figura 13. No íleo, a análise de área dos vilos se mostrou significativa na comparação entre todos os grupos, exceto na comparação entre os grupos GSK e GSK+Iri que apresentou uma significância $p=0,0507$, conforme mostrado na **figura 15**, onde o cálculo da área dos vilos pode ser prejudicada pelo edema causado pela mucosite.

FIGURA 15 – Análise da área do vilão em segmentos intestinais após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3Kδ em camundongos C57BL/6



Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias) e/ou Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino foi coletada no ato da eutanásia e mantida em formol para realização da histologia. As imagens foram fotografadas em microscópio óptico na objetiva de 20x, e medição das estruturas intestinais feitas pelo ImageJ. A área (dada em μm²) dos vilos intestinais mostrou-se reduzida nos grupos que receberam o irinotecano, e essa redução foi ainda mais expressiva quando foi feita a comparação entre os grupos controle e inibidor PI3K delta ($P < 0,05$). Os valores representam a média ± E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 65 animais.

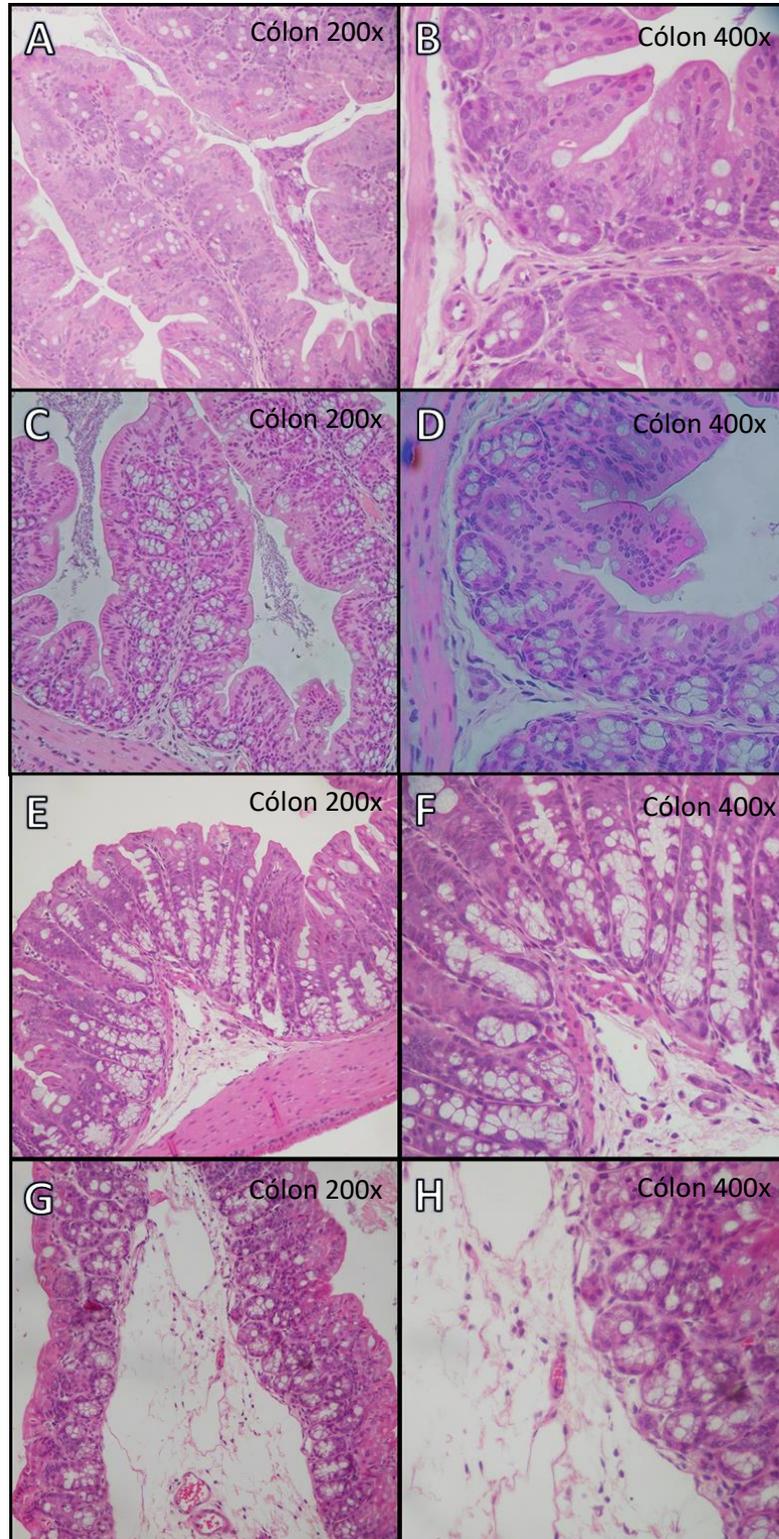
4.5 O uso do Inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano reduz o comprimento intestinal e promove alterações no colón e fígado.

O cólon foi outro tecido avaliado na Histopatologia, apresentando no grupo Controle uma mucosa de cólon sem vilosidades composta por glândulas tubulosas simples (criptas) com numerosas células caliciformes e pequenos enterócitos, apresentando vasos dilatados, por vezes, ectásicos na submucosa. O grupo GSK apresentou quase que os mesmos parâmetros do grupo Controle, exceto pelo tamanho das glândulas tubulosas, que nesse grupo se apresentaram hiperplasia. O grupo Irinotecano apresentou mucosa de cólon discretamente encurtada com glândulas tubulosas hiperplásicas, numerosas células caliciformes e pequenos enterócitos, apresentando também vasos dilatados na submucosa e acúmulo de células inflamatórias mononucleares e pregas grosseiras em algumas amostras. As amostras do grupo GSK+Iri mostraram uma mucosa de cólon sem vilosidades composta por glândulas tubulosas simples (criptas) discretamente hiperplásicas com numerosas células caliciformes e pequenos enterócitos, onde houveram raros vasos dilatados na submucosa, houve o acúmulo de células inflamatórias mononucleares e, em algumas amostras, a presença de pregas grosseiras (**Figura 16**).

No fígado, as imagens da histopatológica mostraram o grupo Controle negativo (DMSO) uma discreta hiperplasia das células de Kupffer. O grupo Irinotecano apresentou parênquima hepático representado por cordões de hepatócitos com discreta tumefação celular e degeneração hidrópica de hepatócitos, leve congestão portal e da veia centrolobular e hiperplasia das células de Kupffer. Houve hemorragia sinusoidal leve e presença de foco inflamatório de fenótipo mononuclear. Por sua vez, o grupo GSK+Iri apresentou parênquima hepático representado por cordões de hepatócitos com tumefação celular variando de leve a moderada, degeneração

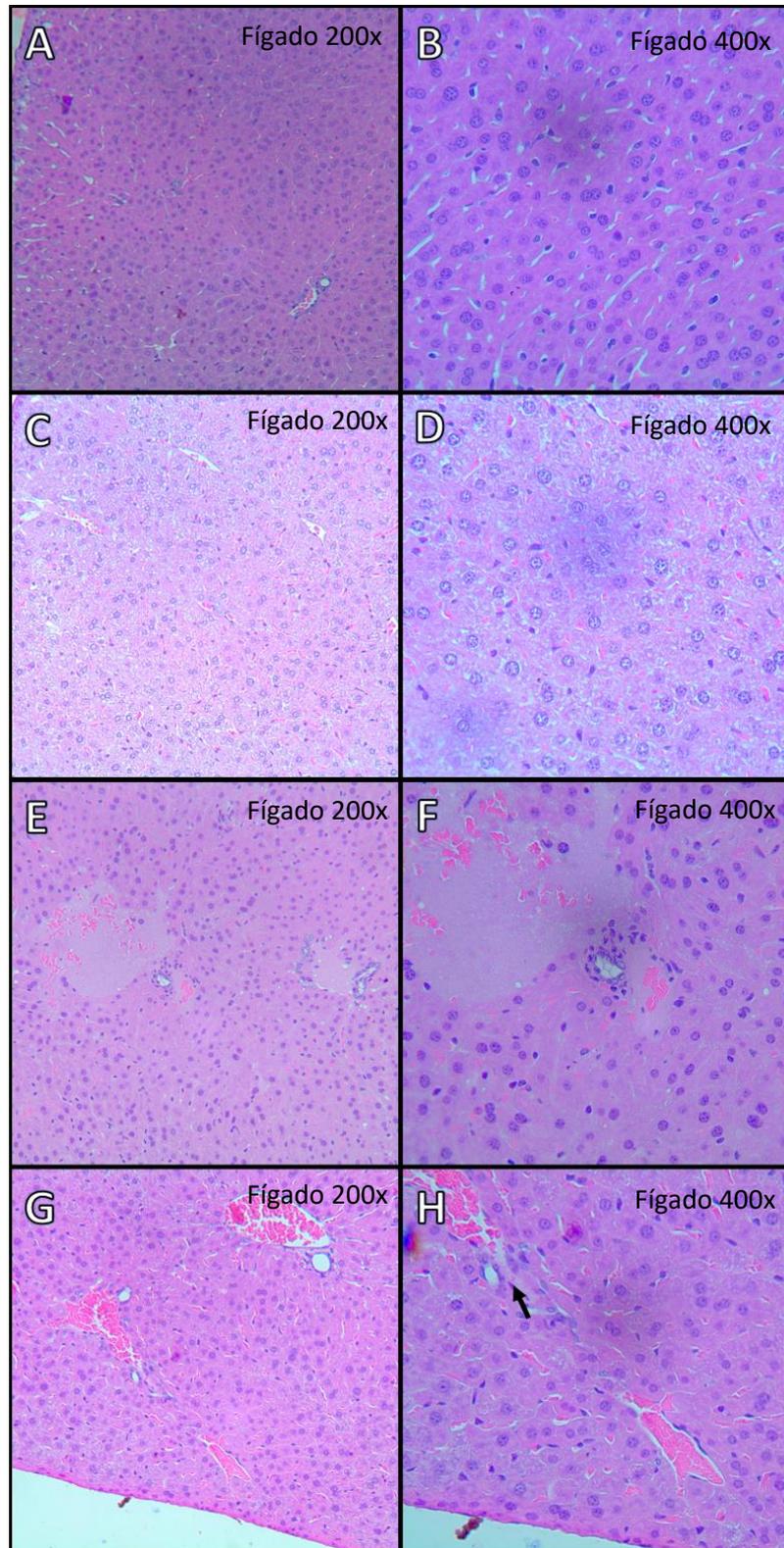
hidrópica de hepatócitos, congestão portal e da veia centrolobular, hiperplasia das células de Kupffer, uma moderada hemorragia sinusoidal associada a edema e presença de focos inflamatórios, como ilustrado na **Figura 17**.

FIGURA 16 - Fotomicrografias de amostras de cólon após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3K δ em camundongos C57BL/6



Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias) e/ou Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de cólon foram coletadas no ato da eutanásia e mantidas em formol para realização da histologia. Imagens A e B (grupo DMSO) mostram o cólon em sua normalidade histopatológica. Imagens C e D (grupo GSK) apresentam tumefação e hiperplasia celular com infiltrado leucocitário. Imagens E e F (grupo Iri) apresentam o tecido do cólon as características histológicas da mucosite induzida por irinotecano. E as imagens G e H (grupo GSK+Iri) apresentam as características da mucosite induzida por irinotecano de maneira intensificada com um maior infiltrado leucocitário e uma maior mudança na arquitetura do tecido. As imagens A, C, E e G estão no aumento de 200x e das imagens B, D, F e H estão no aumento de 400x. N = 65 animais.

FIGURA 17 - Fotomicrografias de amostras de fígado após a injeção do irinotecano e inibidor de PI3K δ em camundongos C57BL/6

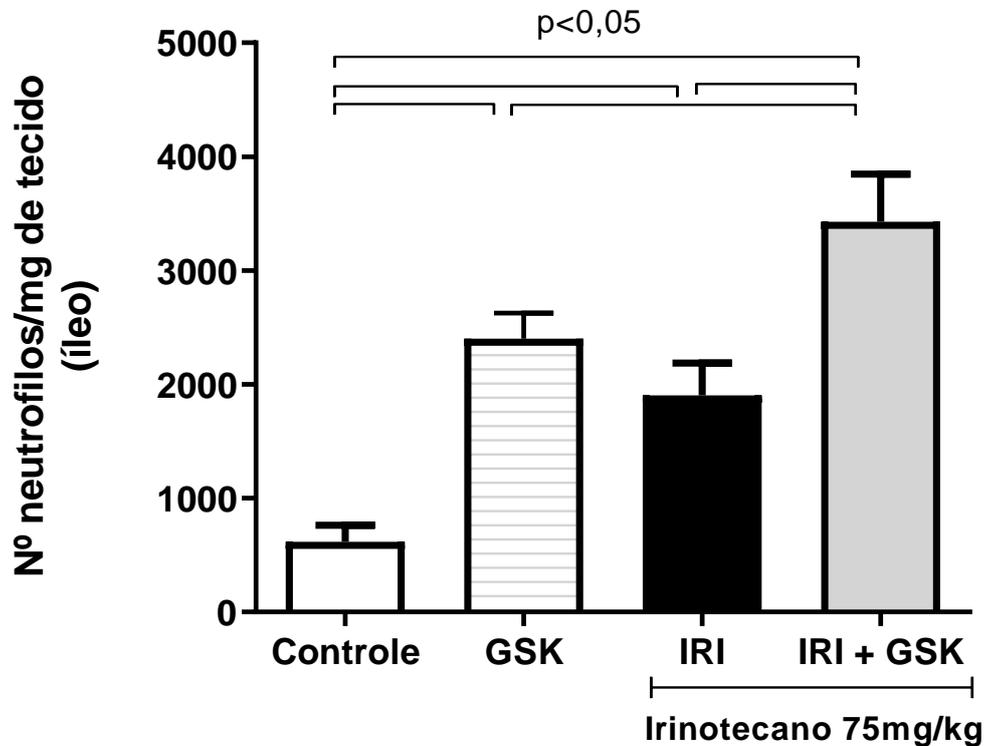


Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias) e/ou Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostras de fígado foram coletadas no ato da eutanásia e mantidas em formol para realização da histologia. Imagens A e B (grupo DMSO) mostram o fígado em sua normalidade histopatológica. Imagens C e D (grupo GSK) apresentam hiperplasia das células de Kupffer. Imagens E e F (grupo Iri) apresentam as características histológicas dos efeitos da mucosite induzida por irinotecano no fígado, como tumefação celular, degeneração hidrópica de hepatócitos e focos inflamatórios. E as imagens G e H (grupo GSK+Iri) apresentam as características histológicas dos efeitos da mucosite induzida por irinotecano no fígado de maneira intensificada com pontos de hemorragia sinusoidal. As imagens A, C, E e G estão no aumento de 200x e das imagens B, D, F e H estão no aumento de 400x. N = 65 animais.

4.6 O inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano promove a migração de neutrófilos para o intestino

A **Figura 18** demonstra que o grupo Controle teve diferença significante com os três outros grupos do nosso experimento. Tanto o irinotecano quanto o inibidor induziram um aumento significativo no infiltrado de neutrófilos no íleo, comparados ao grupo Controle. Quando administrados juntos, esse aumento foi ainda maior (3458 neutrófilos por mg de tecido). Houve diferença significante entre os grupos Irinotecano e o grupo GSK ($p < 0,05$).

Figura 18 – Quantidade de neutrófilos por miligrama de tecido intestinal dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3K δ .

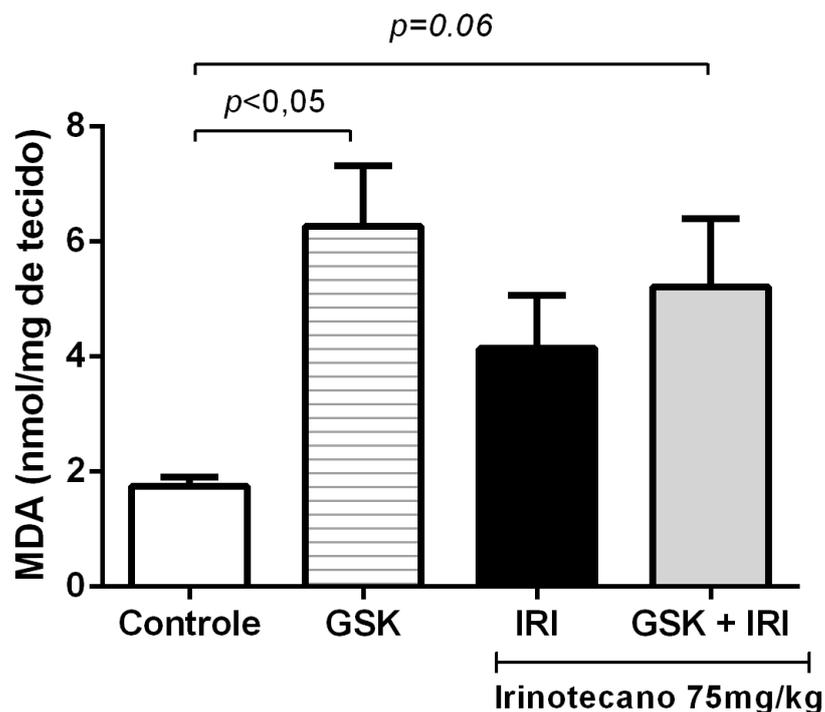


Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino foi coletada no ato da eutanásia, armazenadas a -80°C e submetidas ao ensaio de Mieloperoxidase (MPO). O MPO mostrou que a taxa de migração dos neutrófilos para o tecido intestinal aumentou significativamente nos grupos Irinotecano e GSK quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$). A taxa de migração dos neutrófilos do grupo GSK+Iri foi ainda maior na comparação com o grupo Controle ($p < 0,05$). Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 65 animais.

4.7 O inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano não altera o estresse oxidativo em amostras de intestino

O estresse oxidativo do tecido intestinal, medido pela concentração de malonaldeído (MDA), aumenta significativamente na presença do inibidor de PI3K delta, porém quando há interação do quimioterápico com o inibidor (grupo GSK+Iri) não houve significância estatística quando comparado com o grupo controle ($p=0,08$).

Figura 19 – Concentração de MDA no tecido intestinal dos animais em modelo experimental do Irinotecano + Inibidor de PI3K δ .



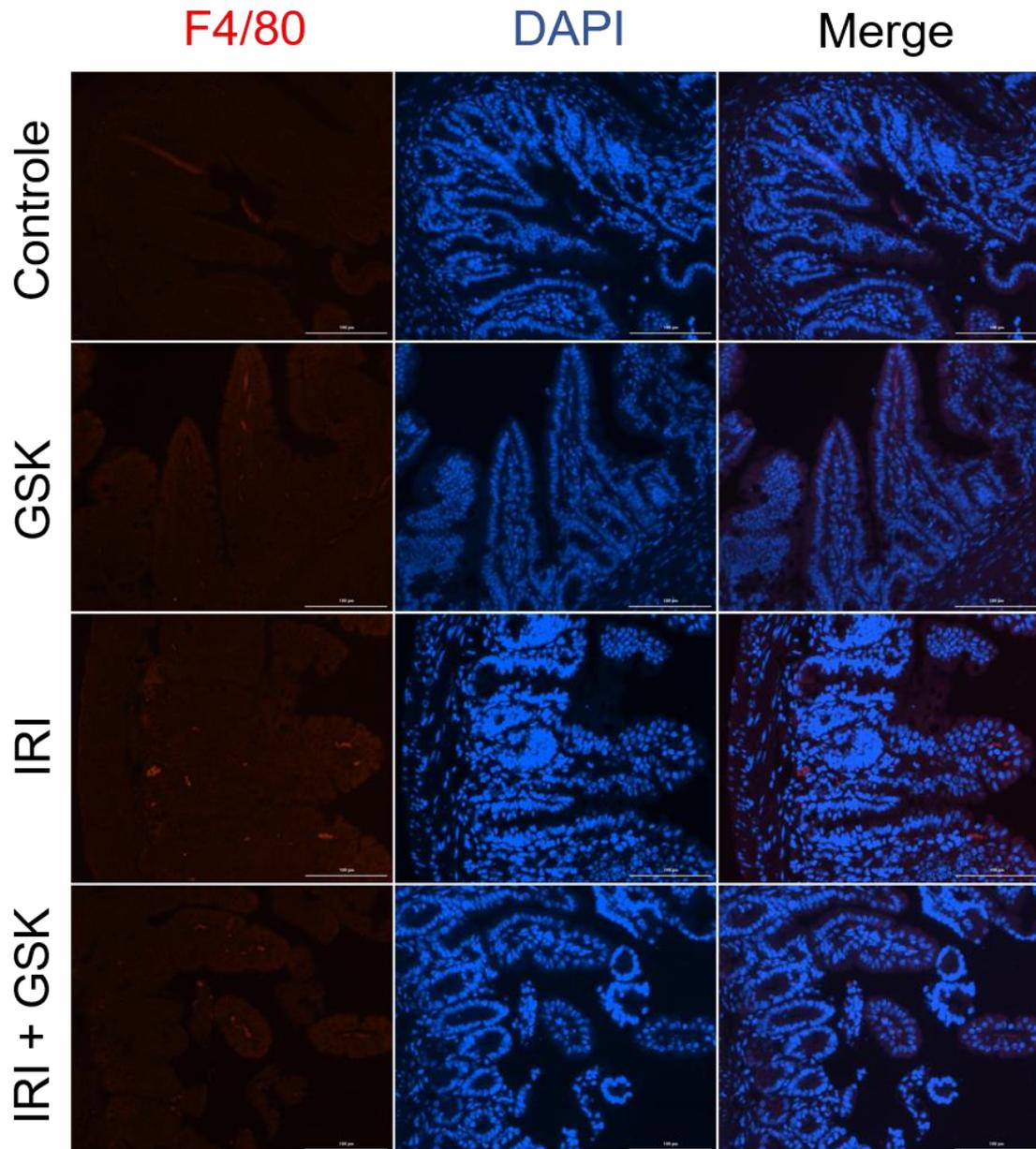
Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino foi coletada no ato da eutanásia, armazenadas a -80°C e realizada a análise de Estresse Oxidativo pelo método do TBARS (Ácido Tiobarbitúrico). A análise do malonaldeído mostrou que a concentração foi significativamente aumentada na presença do GSK. Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 65 animais.

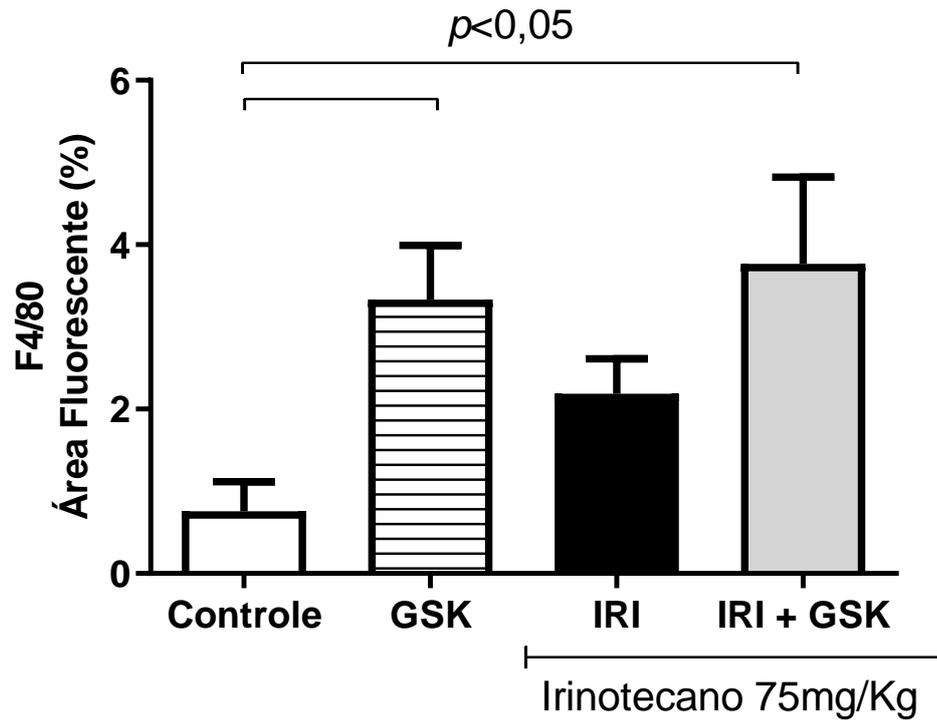
4.8 Quantificação da expressão de marcadores para macrófagos, Células T regulatórias e vias de sinalização intracelular em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano

Durante a imunofluorescência, avaliamos a porcentagem de fluorescência dos anticorpos F4/80, FOXP3 e p-Akt (fosfo-Akt) em amostras de íleo de camundongos comparados ao DAPI. De acordo com a nossa análise, houve significância estatística entre o grupo Controle e o GSK+Iri na quantificação de F4/80. O anticorpo FOXP3 marcou significativamente os grupos Irinotecano e GSK+Iri, quando comparados ao grupo Controle, e também houve significância estatística entre os grupos GSK e Irinotecano quando administrados isoladamente. A porcentagem de fosfo-Akt foi significativa apenas na comparação dos grupos Controle e GSK+Iri.

Essas expressões nos mostram que os marcadores de macrófagos, de células T regulatórias e de vias de sinalização intracelular estiveram aumentadas nos animais que foram tratados com o antineoplásico na presença do Inibidor de PI3K delta, sendo significativa sempre que comparado ao grupo Controle do experimento que foi tratado apenas com o veículo (DMSO).

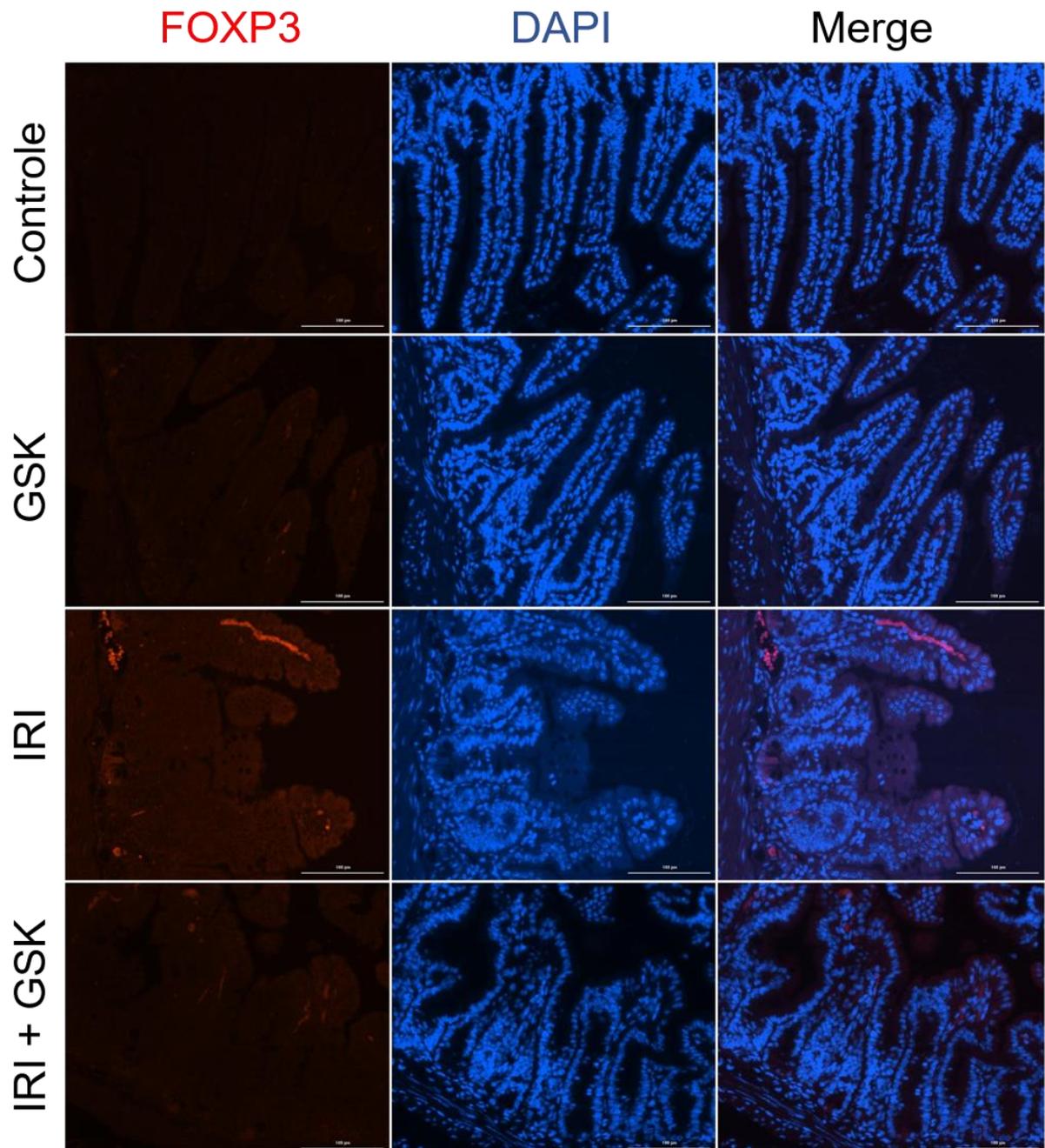
FIGURA 20 – Fotomicrografia e quantificação da intensidade de imunofluorescência de F4/80 em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano

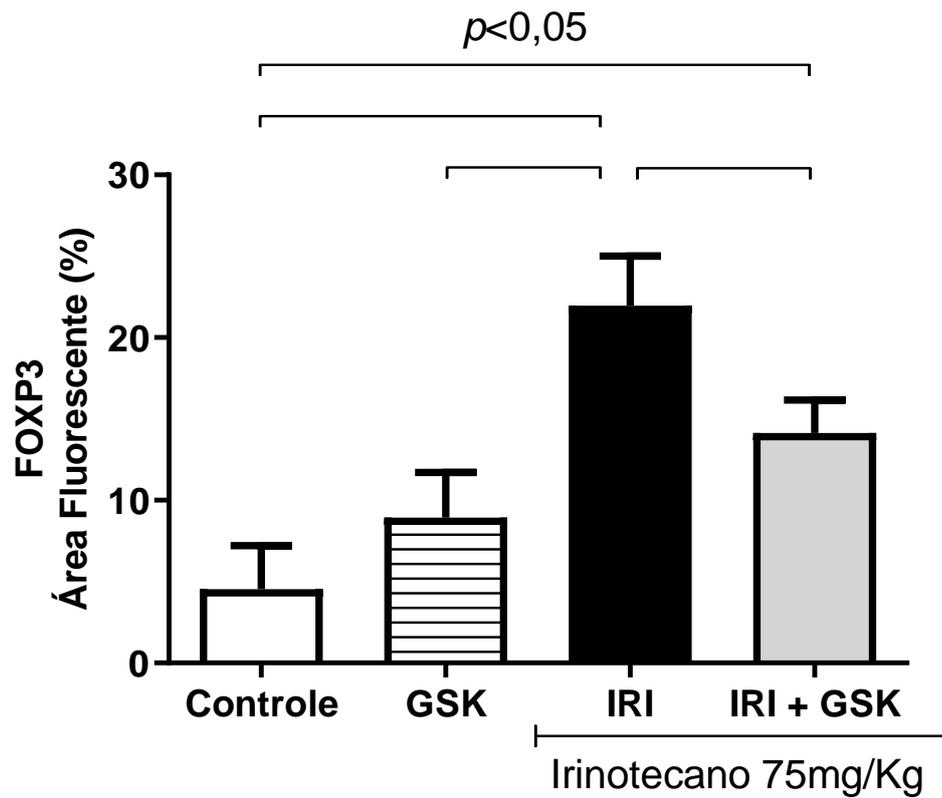




Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino foi coletada no ato da eutanásia, armazenadas a -80°C e realizada a quantificação de área de fluorescência de F4/80 pela imunofluorescência. A análise mostrou que há aumento da área fluorescente nos tecidos dos animais tratados com GSK e GSK+Iri ($p < 0,05$). Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 30 animais.

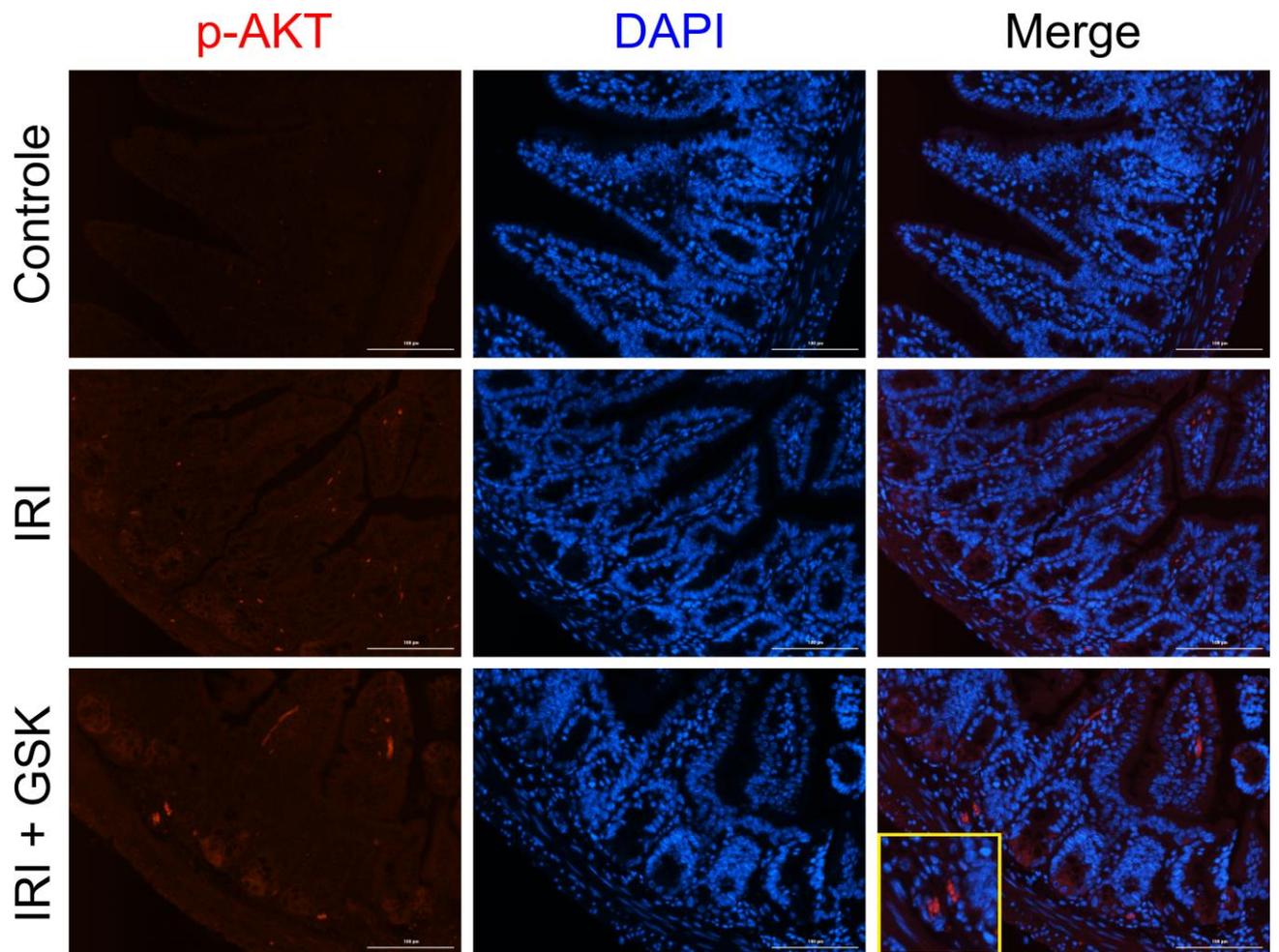
FIGURA 21 – Fotomicrografia e quantificação da intensidade de imunofluorescência de FOXP3 em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano

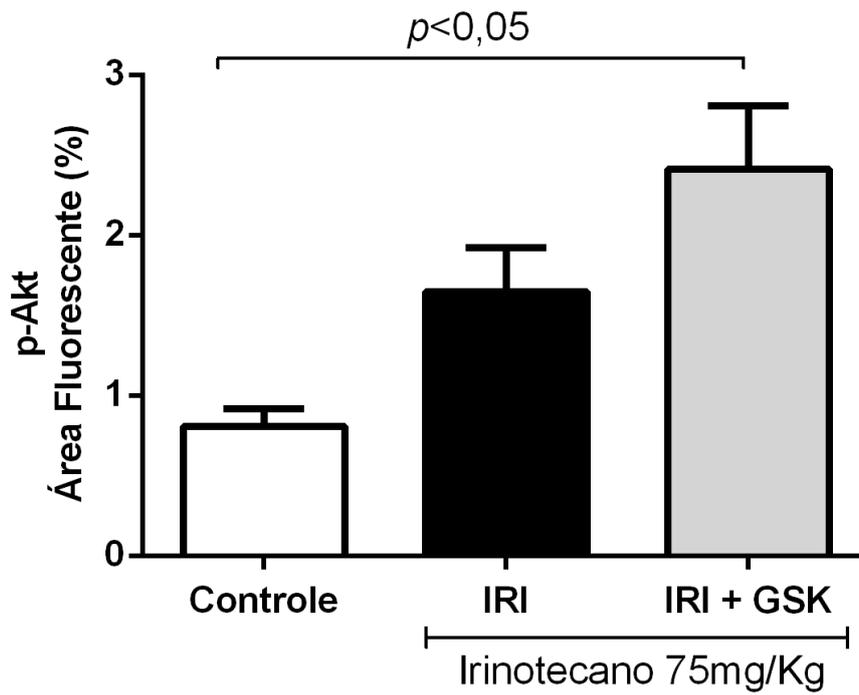




Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino foi coletada no ato da eutanásia, armazenadas a -80°C e realizada a quantificação de área de fluorescência de FOXP3 pela imunofluorescência. A análise mostrou há um aumento da expressão de FOXP3 nos animais que receberam a dose de Irinotecano, tendo expressividade maior no grupo Irinotecano e no grupo GSK+Iri ($p < 0,05$) Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 30 animais.

FIGURA 22 – Fotomicrografia e quantificação da expressão de fosfo-Akt (Akt fosforilado) em amostras de intestino após a administração de inibidor de PI3K delta associado ao irinotecano





Os animais receberam solução veículo DMSO (5mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), Inibidor de PI3K delta (GSK, 3mg/kg v.o/1x dia/6 dias). Amostra de intestino foi coletada no ato da eutanásia e realizada a avaliação da expressão de fosfo-Akt por imunofluorescência. Os valores representam a média \pm E.P.M (Erro padrão da média). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. N = 35 animais.

5 DISCUSSÃO

As isoformas de PI3K foram descritas como sinalizadoras importantes em várias doenças inflamatórias, principalmente a PI3K δ e PI3K γ (PORTA *et al.*, 2014). Voltando atenção para a biologia do câncer, o aumento da expressão da enzima p110 δ atua como um direcionador no sentido da promoção do desenvolvimento do câncer em alguns tumores sólidos, incluindo mama, próstata, colorretal, câncer de fígado, carcinoma de células Merkel, glioblastoma e neuroblastoma. Além disso, os inibidores seletivos de p110 δ estão sendo estudados como potenciais tratamentos de agente único ou em esquemas de combinação de fármacos na tentativa de melhorar a resposta à imunoterapia do câncer. Ambas as estratégias têm se mostrando promissoras para o tratamento de tumores, dentre eles o câncer colorretal (XENOU & PAPAKONSTANTI, 2020).

No presente trabalho evidenciamos que o irinotecano induziu a mucosite intestinal e que ao combinarmos com o inibidor de PI3K delta, o processo inflamatório sofreu intensificação. Observou-se nos animais tratados com o inibidor associado ao irinotecano uma maior infiltração de neutrófilos e macrófagos na mucosa intestinal, diminuição do comprimento do intestino delgado e da área de vilosidades, além de alterações da arquitetura intestinal e do fígado quando comparado ao grupo irinotecano ou ao controle sem tratamento. Aliado a esses achados, a combinação desses fármacos promoveu uma diminuição de células imunossupressoras como os linfócitos T regulatórios e um aumento da expressão de fosfo-Akt.

O Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) apresenta uma ampla experiência com os modelos de toxicidade induzidos pela quimioterapia. O modelo de mucosite intestinal por irinotecano foi padronizado por Melo e colaboradores (2008). Os autores mostraram que a injeção de 75 mg/kg de irinotecano

durante 4 dias causa diarreia e a mucosite intestinal com dano de mucosa, perda da altura de vilosidades e de células epiteliais intestinais, vacuolização e necrose celular. Tais achados foram corroborados por outros estudos posteriores relativos à ação lesiva do irinotecano sobre a mucosa intestinal, descrita por pesquisadores do LAFICA (MELO et al, 2008; LIMA-JÚNIOR et al, 2012, WONG et al, 2015; FERNANDES et al, 2018), bem como pesquisadores de outros grupos (IKUNO *et al.*, 1995; KURITA *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2013, 2007; BOEING *et al.*, 2020).

De forma interessante, no presente trabalho observamos apenas a hiperemia da alça intestinal. Porém, a diarreia e efeitos adversos mais graves não foram observados na dose de 75mg/Kg, considerada atualmente como uma sub-dose para o experimento nos padrões atuais. Esse achado está de acordo com os dados anteriores obtidos por Teixeira (2015), que, ao utilizar camundongos C57BL/6 do Biotério de Ribeirão Preto e administrados com irinotecano na dose de 75 mg/kg evidenciou uma lesão intestinal de menor vulto e ausência de diarreia. Essa resistência dos camundongos ao irinotecano, provavelmente, se estabeleceu após a utilização de novas matrizes de camundongos C57BL/6 SPF *Specific Pathogen Free* (SPF) do biotério do NPDM, conferindo mudanças na microbiota desses animais de experimentação o que pode impactar no desenvolvimento do modelo experimental. De fato, Gibson (2013) destacou que mudanças da microbiota como um dos possíveis fatores relevantes na indução da mucosite intestinal. O'Rourke *et al.* (1988) demonstraram a influência da variação da microbiota gastrointestinal no sistema imunológico e sobre a suscetibilidade à infecção.

Ao se observar o papel da microbiota na indução de doença inflamatória intestinal, percebe-se claramente uma diferença entre os camundongos gnotobióticos livres de patógenos específicos (SPF) com alterações na composição da microbiota.

Roy *et al* (2017) observaram que distintas comunidades microbianas acarretam o desenvolvimento ou resistência de inflamação intestinal em hospedeiros imunocompetentes, sugerindo que o desencadeamento de diferentes vias imunológicas por comunidades microbianas pode alterar a suscetibilidade a doenças (ROY *et al.*, 2017). Essas observações podem explicar, de certa forma, a diferença na indução da mucosite intestinal na dose de 75 mg/kg nos camundongos SPF.

A diminuição no comprimento intestinal dos animais, mostrado nesse trabalho, também foi análogo ao evidenciado no trabalho de Arifa *et al.* (2014), onde foram analisados a ativação de inflamassomas mediado por IL-1 β e IL-18 em camundongos na mucosite induzida por irinotecano e na colite induzida por sulfato de dextrano de sódio. Os autores mostraram que o irinotecano reduz o comprimento do intestino delgado (ARIFA *et al.*, 2014)

As análises histopatológicas do intestino delgado mostraram que os animais que receberam apenas o inibidor de PI3K apresentaram uma aparente hiperplasia de células pró-inflamatórias, quando comparado ao grupo controle, ocasionando uma alteração na área das vilosidades. Vias dependentes de PI3K/Akt são envolvidas com a sobrevivência celular e podem explicar esses achados. Um exemplo dessa visão envolve a ativação de receptores esteroidais que, através dos seus receptores, modula a via PI3K/Akt gerando uma hiperplasia celular, como já foi observado na Hiperplasia Benigna da Próstata (Jin *et al.*, 2010; SEIBEL, 2014).

A análise morfométrica nos animais mostrou uma redução das vilosidades e também uma tumefação das criptas, porém de caráter mais inflamatório devido à presença de infiltrados inflamatórios nos animais que receberam apenas o Irinotecano. Em adição, o grupo GSK+IRI, no íleo, apresentou uma redução maior na área das vilosidades do que na razão vilo/cripta comparado aos outros segmentos

intestinais. Ao analisarmos os aspectos microscópicos do intestino grosso, as características inflamatórias também foram evidenciadas, onde o grupo GSK+Iri apresentou vasos dilatados na submucosa e células inflamatórias mononucleares dispersas. No fígado, o grupo GSK apresentou apenas a tumefação celular, enquanto o grupo da associação de irinotecano e GSK apresentou edema, áreas hemorrágicas e focos inflamatórios no órgão com infiltrado de fenótipo mononuclear. Um processo inflamatório em curso no trato gastrointestinal é crítico para as alterações morfológicas teciduais, como as observadas neste estudo, e agrega risco ao paciente (MELO *et al.*, 2008; HASSETT *et al.*, 2006).

Em humanos, Hassett e colaboradores (2006) ao compararem, em duas coortes de pacientes com câncer de mama, as taxas de visitas em emergências e de hospitalizações dos pacientes, por eventos adversos graves, mostraram que estas aumentam significativamente (16% versus 5% $p < 0,001$, $n = 3526$ pacientes) no grupo dos pacientes com eventos adversos graves relacionados à quimioterapia. Ademais, esses autores, ao avaliarem a incidência de vários eventos adversos na população acima referida, evidenciaram que eventos adversos considerados graves por ameaçarem à vida (febre ou infecção, neutropenia ou trombocitopenia, disfunção renal, náuseas vômitos ou diarreias, trombose venosa profunda ou tromboembolismo pulmonar) estão presentes em um índice quatro vezes maior naqueles pacientes com quimioterapia em curso (HASSETT *et al.*, 2006).

A mielossupressão é um dos efeitos colaterais comuns observado com frequência nos pacientes oncológicos que recebem a quimioterapia a base de irinotecano. Loupakis e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos colaterais provocados pelo regime de FOLFIRI (5-fluorouracil, irinotecano e leucovorin) associado ao Bevacizumabe (anticorpo monoclonal anti-VEGF) em pacientes com

câncer colorretal avançado. Os pesquisadores mostraram uma incidência de neutropenia graus 3 e 4 (moderado a grave) de 20,5% nos pacientes que receberam a combinação de FOLFIRI e Bevacizumabe (Loupakis et al., 2014). Os resultados aqui mostrados, deixaram em evidência que a injeção de irinotecano causa uma leucopenia ou redução do número total de leucócitos circulantes. Essa leucopenia contribui para a instalação de um processo infeccioso e inflamatório. Contudo, a incorporação do inibidor de PI3K-delta sozinho causou também a leucopenia e agravou a mesma quando combinado ao irinotecano, o que pode sugerir que esta enzima não tem relevância para o processo proliferativo celular na medula óssea, que nessa situação o inibidor pode agregar danos, mas que a combinação de ambos os fármacos não se constitui como um fator de risco adicional para a mielossupressão.

Ainda no contexto dos fatores inflamatórios, os microrganismos patogênicos apresentam Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs) que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores do tipo Toll (TLR) presentes em diversas células epiteliais, inflamatórias e imunológicas. A interação de PAMPs com os TLRs ativa fatores de transcrição, como o NF- κ B e MAP quinases, que conduzem ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias (TARTEY & TAKEUCHI, 2017).

Devido à consequente ruptura da barreira da mucosa, infecções locais e sistêmicas podem se desenvolver. Nesse sentido, Wong e colaboradores (2021) evidenciaram que a mucosite intestinal induzida pelo irinotecano leva à bacteremia (presença de bactérias no sangue), principalmente marcada por translocação bacteriana gram-negativa (*Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*) para o linfonodo mesentérico e fígado e aumento da expressão de TLR4 no íleo (WONG et al, 2021; dados submetidos).

As enzimas PI3K têm sido descritas como importantes moléculas de sinalização de receptores da família TLR/IL-1R (FUKAO & KOYASU, 2003). Adicionalmente, Wong e colaboradores (2015) avaliaram o papel dos TLRs e da proteína adaptadora MyD88 no curso da mucosite intestinal. Os autores mostraram que animais *knockout* para TLR2, TLR9 ou *knockout* para MyD88 apresentam menor dano funcional intestinal, marcado por reduzida diarreia, bem como reduzidas alterações morfométricas, histopatológicas e inflamatórias quando comparados com os camundongos selvagens tratados com Irinotecano (WONG *et al.*, 2015).

A mucosite intestinal resulta da interação sequencial da agressão do quimioterápico ao epitélio, favorecendo a liberação de citocinas, como TNF-alfa, IL-1beta, KC (MELO *et al.*, 2008), IL-18 (LIMA-JÚNIOR, *et al.*, 2014) e IL-33 (Guabiraba *et al.*, 2014) e ativação de enzimas pró-inflamatórias, incluindo a ciclooxigenase-2 (HORIKAWA *et al.*, 2007) e óxido nítrico sintase induzida (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Sendo assim, as pesquisas mostram a participação de inúmeras citocinas e de receptores toll-like na regulação de mecanismos imunológicos inatos e adaptativos na patogênese da mucosite intestinal (RIBEIRO *et al.*, 2016), ressaltando-se que muitos desses mediadores atuam ativando células por vias dependentes de enzimas PI3K.

A terapia alvo anti-câncer como, por exemplo, inibidores das vias EGFR/RAF/MEK e inibidores da via PI3K/AKT/mTOR, tem sido associada ao surgimento de importantes toxicidades gastrointestinais, que variam de inflamação da mucosa e dor orofaríngea sem evidente erosão até uma grave estomatite ou diarreia grave (BOERS-DOETS *et al.*, 2013).

Os resultados aqui apresentados evidenciaram um aumento da expressão de p-Akt (fosfo-Akt) à análise por imunofluorescência de forma mais pronunciada no grupo que recebeu a associação do inibidor de PI3K delta e irinotecano, aliado a um

intenso processo inflamatório. Esse achado está correlacionado ao aumento da ativação da via PI3K/Akt/mTOR, que por sua vez está ligada a uma maior toxicidade gastrointestinal.

Corroborando esses achados, CARVALHO (2016) avaliou o papel do Everolimo, um inibidor de mTOR, na mucosite induzida por irinotecano. Camundongos que receberam irinotecano apresentaram um aumento na expressão gênica do RNAm de PI3K, Akt e mTOR. Adicionalmente, a inibição do mTOR com rapamicina ou everolimo agrava a mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, corroborados pela perda de peso, diarreia, histopatologia, infiltração de neutrófilos e mediadores inflamatórios como TGF- β e IFN- γ .

Pelos motivos acima expostos, no presente trabalho, foi analisada a expressão da fosfo-Akt. Contudo, de forma paradoxal, observou-se um aumento da expressão de fosfo-Akt, o que nos leva a pensar que esse aumento provavelmente dependa de outra isoforma de PI3K, como a PI3K-gama, muito envolvida no processo de recrutamento de leucócitos para sítios de inflamação (HIRSCH *et al.*, 2000).

Também analisamos a expressão de F4/80, os nossos resultados mostraram um aumento de forma significativa na sua expressão em camundongos administrados com o inibidor de PI3K delta e irinotecano. F4/80 é um dos principais marcadores de linhagens de macrófagos ativados e que estão associados à progressão tumoral e ao desenvolvimento de quimiorresistência (CASSETTA *et al.*, 2016). Lima-Júnior e colaboradores (2014) mostraram que o irinotecano promove o aumento da marcação de F4/80 nas amostras de intestino.

Com a análises desses segmentos intestinais e fígado, percebemos ainda mais que a inibição da PI3K δ tem diferentes performances dependendo do órgão-alvo da

terapia. Watson *et al.* (2007) evidenciaram que o inibidor específico da p110 δ mostra efeitos anti-inflamatórios, principalmente quando inalado (MARTUCCI *et al.*, 2020), reduzindo as respostas mediadas por Th2 sem afetar a imunidade mediada por Th1, contribuindo para redução da morbidade em pacientes alérgicos, com menor produção de muco nos pulmões, degranulação de mastócitos e recrutamento de leucócitos.

Esses achados tiveram impacto por minimizar os efeitos sistêmicos do inibidor (MEDINA-TATO *et al.*, 2007), trazendo perspectiva do uso dessas enzimas como alvo terapêutico para doenças respiratórias. Essa mudança pode ocorrer dependendo do tipo de administração, dose e via de inibição, que impedem a fosforilação de Akt como esperado e regularam negativamente a expressão de fatores inflamatórios, como TNF α e iNOS, o que nos sugere que os inibidores da PI3K podem ser usados para atenuar a inflamação através da regulação negativa da expressão do gene inflamatório (MOILANEN *et al.*, 2015). Porém, quando voltado para o intestino, no caso deste trabalho, o inibidor de PI3K δ se apresentou como pró-inflamatório.

Tal observação pode ser devida ao papel protetor que uma resposta imunológica de baixo grau exerce no controle da translocação bacteriana. Contudo, a inibição da PI3K-delta pode contar como um fator para suprimir esse padrão de resposta basal, levando a um agravamento da inflamação em longo prazo devido à ativação de vias inflamatórias compensatórias, podendo, inclusive, serem mediadas por outras isoformas de PI3K, tal como ocorre com receptores TLR inibidos de forma seletiva (WONG *et al.*, 2021, artigo submetido).

Em modelos de inflamação intestinal induzida pela quimioterapia observa-se o aumento dos níveis de malondialdeído (MDA), através do TBARS, como relatado por Arifa *et al.* (2014), corroborando os nossos resultados. Os pesquisadores mostraram

que o iNOX-2 aumenta as espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüentemente os níveis de TBARS (ARIFA *et al.*, 2014).

O aumento significativo dos níveis de MDA no grupo GSK se dá pelo aumento de TBARS nos tecidos que são submetidos à inibição de PI3K. Esse resultado já foi descrito por Gulati & Singh (2014), que analisaram os níveis de TBARS em camundongos administrados com Wortmanina, um esteroide retirado de fungos do gênero *Penicillium*, que é usado na pesquisa como um potente inibidor não específico de PI3K.

Mais recentemente, mostrou-se que o flavonoide Luteolina previne o dano intestinal após a injeção da quimioterapia por atenuar o estresse oxidativo e o processo inflamatório (BOEING *et al.*, 2019). A mucosite intestinal por irinotecano aumentou os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) no duodeno (BOEING *et al.*, 2020). De forma interessante, nossos resultados não mostraram um aumento significativo de malonaldeído (MDA) induzido pelo irinotecano, possivelmente por estarmos diante de uma sub-dose de irinotecano, como discutido anteriormente, mas a administração de irinotecano e o inibidor de PI3K delta promoveu o aumento desse parâmetro de estresse oxidativo. Sabe-se que o estresse oxidativo é o mecanismo pelo qual células inflamatórias fagocitárias atuam com o objetivo de eliminar microorganismos (SÔNEGO *et al.*, 2016). De forma consistente, observamos que houve uma potencialização do acúmulo de neutrófilos no intestino do grupo de animais injetado com a combinação de fármacos. Tal observação pode contar para o aumento de MDA no intestino, explicando, em conjunto o dano tecidual aumentado.

A expressão de FOXP3 também foi analisada por se tratar de um fator de transcrição que suprime processos inflamatórios e estimula a expressão de células T

regulatórias, que são importantes na homeostasia do ambiente tumoral. Em um trabalho de 2018, também realizado no LAFICA, Fernandes et al. explicou o papel regulatório das células Treg na mucosite intestinal induzida por irinotecano, mostrando que a mucosite intestinal causou um acúmulo das células Tregs e Th17, evidenciando o aumento da expressão de FOXP3 em animais que receberam doses de irinotecano e que a depleção de células Treg exacerba o dano intestinal, diarreia, infiltração de neutrófilos e mortalidade animal, apesar de apresentar uma redução do número de células Th17.

Na avaliação de expressão de FOXP3 por imunofluorescência e observamos um aumento significativo nos camundongos tratados com irinotecano. Entretanto, o grupo tratado com a combinação de irinotecano e inibidor de PI3K delta reduziu a expressão de FOXP3. É descrito na literatura que a inibição da PI3K regula a expressão de FOXP3 através do sequestro ou inativação das proteínas Foxo, Foxo1 e Foxo3a, que regulam a proliferação, o metabolismo celular e a tolerância ao estresse (MERKENSCHLAGER & VON BOEHMER, 2010). Por ser o FOXP3 um fator de transcrição crítico no processo de sinalização imunossupressora mediada por linfócitos T reguladores, compreende-se que houve a amplificação do processo inflamatório intestinal, em parte, pela inibição dessa via anti-inflamatória.

Coutrè e colaboradores (2015) publicaram numa revisão referente ao manejo dos eventos adversos associados ao tratamento com idelalisibe, um inibidor de PI3K delta. O Idelalisibe é um fármaco prescrito por via oral para o tratamento de neoplasias hematológicas, porém cursando com evidente colite e hepatotoxicidade (COUTRÉ *et al.*, 2015). Esses achados nos revelaram a necessidade de analisarmos histopatologicamente as amostras de fígado no presente trabalho. Assis-Júnior *et al.* (2017) demonstraram que a administração de irinotecano cursa com dano intestinal e

translocação bacteriana para o fígado, causando uma outra toxicidade conhecida como esteato-hepatite (MARCOLINO ASSIS-JÚNIOR *et al.*, 2017). No presente estudo, a combinação de irinotecano e GSK contribuiu para agravar a lesão hepática por, possivelmente, favorecer o processo de translocação bacteriana a partir do intestino cujo padrão de lesão evidente. Contudo, essa hipótese de translocação não foi testada neste estudo. A identificação de pacientes com os primeiros sinais de mucosite grave é altamente desejável, mas não há meios para tratar especificamente a doença e o manejo clínico continua sendo sintomático e um desafio devido aos mecanismos não completamente conhecidos. Dessa forma, a associação de uma terapia alvo como o Idelalisibe e a quimioterapia citotóxica a base de irinotecano, certamente, poderia acarretar um intenso processo inflamatório e, por conseguinte, maior toxicidade gastrointestinal nos pacientes que venham fazer o uso combinado desses medicamentos, a despeito da potencialização dos efeitos antitumorais resultante da combinação dos fármacos.

6 CONCLUSÃO

No trabalho, evidenciamos que a associação do Inibidor de PI3K delta com o quimioterápico irinotecano exacerba os parâmetros gerais de inflamação na mucosite intestinal induzida por irinotecano em paralelo a uma redução da expressão de FOXP3, um marcador de células Treg. Esses achados sugerem que o uso combinado desses fármacos deve ser visto com cautela no contexto clínico.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, K.S.; SANTOS, J.M.; CAMBRUSSI, M.C.; PICOLOTTO, S.; CARNEIRO, M.B. Segurança do paciente e o valor da intervenção farmacêutica em um hospital oncológico. **Einstein**, vol.16, no.1, São Paulo, 2018.

AKSOY, E.; TABOUBI, S.; TORRES, D.; DELBAUVE, S.; HACHANI, A.; WHITEHEAD, M.A.; PEARCE, W.P.; BERENJENO, I.M.; NOCK, G.; FILLOUX, A.; *et al.* The p110 δ isoform of the kinase PI(3)K controls the subcellular compartmentalization of TLR4 signaling and protects from endotoxic shock. **Nat. Immunol.** 2012. 13,1045–1054.

ALIMONTI, A.; GELIBTER, A.; PAVESE, I.; SATTA, F.; COGNETTI, F.; FERRETTI, G.; RASIO, D.; VECCHIONE, A.; PALMA, M.D. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer. Treat. Rev.**, v.30, p. 555-562. 2004.

ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, RUSSO M, CUNHA, F.Q. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit. Care Med.** 34, 461–470, 2006.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What Is Cancer?** Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>. Acesso em: 30 Out 2020.

ANGADI, P.V.; KRISHNAPILLAI, R. Evaluation of PTEN immunoexpression in oral submucous fibrosis: Role in pathogenesis and malignant transformation. **Head Neck Pathol** 2012; 6: 314-21.

ARIFA, R.D.; MADEIRA, M.F.; De PAULA, T.P.; LIMA, R.L.; TAVARES, L.D.; MENEZES-GARCIA, Z; FAGUNDES, C.T.; RACHID, M.A.; RYFFEL, B.; ZAMBONI, D.S.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G. Inflammasome activation is reactive oxygen

species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice. **Am J Pathol.** 2014 Jul;184(7):2023-34. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.03.012. PMID: 24952429.

BALLESTER, V.; RASHTAK, S.; BOARDMAN, L. Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. **World J Gastroenterol.** 2016 Feb 7; 22(5): 1736–1744.

BARBOSA, R.F.M.; TONETI, B.F.; AVELAR, U.M.P.A.; BAVIERA, A.F.; OKINO, L.; SAWADA, N.O. Incidência de neutropenia induzida por quimioterapia no tratamento do câncer colorretal. **Rev Rene**, Fortaleza, v. 20, e33884, 2019.

BINEFA, G.; RODRÍGUEZ-MORANTA, F.; TEULE, A.; MEDINA-HAYAS, M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. **World J Gastroenterol.** 2014 Jun 14;20(22):6786-808. doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6786.

BOEING, T.; DE SOUZA, P.; SPECA, S.; *et al.* Luteolin prevents irinotecan-induced intestinal mucositis in mice through antioxidant and anti-inflammatory properties. **Br J Pharmacol.** 2020; 177: 2393– 2408. <https://doi.org/10.1111/bph.14987>

BOSSI, P.; LUCCHESI, M.; ANTONUZZO, A. Gastrointestinal toxicities from targeted therapies: measurement, duration and impact. **Curr Opin Support Palliat Care** 2015, 9:163–167.

BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J.; CUMMINS, A.G. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support Care Cancer.** 2006. 14:713–731.

BRACKS, I.V.; ARMADA, L; GONÇALVES, L.S.; PIRES, F.R. Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. **J Endod.** 2014 Jan;40(1):63-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.037. Epub 2013 Nov 1. PMID: 24331993.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, R.L.; SIEGEL, L.A; TORRE, A. Jemal Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J. Clin.**, 2018, pp. 394-424.

BOERS-DOETS, C.B.; RABER-DURLACHER, J. E.; TREISTER, N.S.; EPSTEIN, J. B.; ARENDS, A. B. P.; WIERSMA, D. R.; LALLA, R. V.; LOGAN, R. M.; VAN ERP, N. P.; GELDERBLOM, H. Mammalian target of rapamycin inhibitor-associated stomatitis **Future Oncology** 2013 9:12, 1883-1892

BRUHN, M. A.; PEARSON, R. B.; HANNAN, R. D.; SHEPPARD, K. E. AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. **Cancer Management and Research**, v.5, n. 1, p. 281-292, 2013.

CAMPBELL, J.M.; STEPHENSON, M.D.; BATEMAN, E.; PETERS, M.D.; KEEFE, D.M.; BOWEN, J.M. Irinotecan-induced toxicity pharmacogenetics: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. **Pharm. J.** 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/tpj.2016.58>

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science.** 2002 May 31;296(5573):1655-7. doi: 10.1126/science.296.5573.1655. PMID: 12040186.

CANTLEY, L.C.; WHITMAN, M.; CHAHWALA, S.; *et al.* Oncogenes and phosphatidylinositol turnover. **Ann N Y Acad Sci** 1986; 488:481-90.

CÂRTÂNĂ, E.T.; GHEONEA, D.I.; SĂFTOIU, A. Advances in endoscopic ultrasound imaging of colorectal diseases. **World J Gastroenterol**. 2016 Feb 7; 22(5): 1756–1766.

CARVALHO, L. L. Inibição do mTOR agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano. Fortaleza, 2016. [**Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Ceará**]

CASSETTA, L.; NOY, R.; SWIERCZAK, A.; SUGANO, G.; SMITH, H.; WIECHMANN, L.; POLLARD, J.W. Isolation of Mouse and Human Tumor-Associated Macrophages. **Adv Exp Med Biol**. 2016;899:211-29. doi: 10.1007/978-3-319-26666-4_12. PMID: 27325269; PMCID: PMC5024544.

CHAVES, P.L.; GORINI, M.I.P.C. Qualidade de vida do paciente com câncer do colorretal em quimioterapia ambulatorial. **Rev Gaúcha Enferm**. Porto Alegre (RS). n.32, v.4, p.767-773, 2011

CHESTER, J. D. et al. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J Clin Oncol**. v. 15, n. 21, p.1125-32, 2003.

CINAUSERO, M.; APRILE, G.; ERMACORA, P.; BASILE, D.; VITALE, M.G.; FANOTTO, V.; PARISI, G.; CALVETTI, L.; SONIS, S.T. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. **Front Pharmacol**. 2017 Jun 8; 8:354.

COURTNEY, K. D.; CORCORAN, R. B.; ENGELMAN, J. A. The PI3K pathway as drug target in human cancer. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 6, p. 1075-83, Feb 20 2010. ISSN 0732-183x.

COUTRÉ, S.E.; BARRIENTOS, J.C.; BROWN, J.R.; DE VOS, S.; FURMAN, R.R.; KEATING, M.J.; LI, D.; O'BRIEN, S.M.; PAGEL, J.M.; POLESKI, M.H.; SHARMAN, J.P.; YAO, N.S.; ZELENETZ, A.D. Management of adverse events associated with idelalisib treatment: expert panel opinion. **Leuk Lymphoma**. 2015;56(10):2779-86. doi: 10.3109/10428194.2015.1022770. Epub 2015 May 19. PMID: 25726955; PMCID: PMC4732460.

CUNHA, F. Q. *et al.* Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 238, p. 47-52, 1993.

CURIGLIANO, G.; SHAH, R. R. Safety and Tolerability of Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Inhibitors in Oncology. **Drug Saf**. 2019 Feb;42(2):247-262. doi: 10.1007/s40264-018-0778-4. PMID: 30649751.

DA SILVA, F.C.; WERNHOFF, P.; DOMINGUEZ-BARRERA, C. DOMINGUEZ-VALENTIN, M. Update on Hereditary Colorectal Cancer. **Anticancer Research** September 2016 vol. 36 no. 9 4399-4405

DODDS, H. M.; RIVORY, L. P. The mechanism for inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (CPT-11). **Mol. Pharmacol.**, v.56, p.1346-1353, 1999.

DOWN, K.; AMOUR, A.; BALDWIN, I.R.; COOPER, A.W.; DEAKIN, A.M.; FELTON, L.M.; GUNTRIP, S.B.; HARDY, C.; HARRISON, Z.A.; JONES, K.L.; JONES, P.; KEELING, S.E.; LE, J.; LIVIA, S.; LUCAS, F.; LUNNISS, C.J.; PARR, N.J.; ROBINSON, E.; ROWLAND, P.; SMITH, S.; THOMAS, D.A.; VITULLI, G.; WASHIO, Y.; HAMBLIN, J.N. Optimization of Novel Indazoles as Highly Potent and Selective Inhibitors of Phosphoinositide 3-Kinase δ for the Treatment of Respiratory Disease. **J Med Chem**. 2015 Sep 24;58(18):7381-99. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00767. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26301626.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 550-62, Aug 2009. ISSN 1474-175x

FAIVRE, S.; KROEMER, G.; RAYMOND, E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. In: (Ed.). **Nat Rev Drug Discov**. England, v.5, 2006. p.671-88.

FALASCA, M.; MAFFUCCI, T.; CAMPA, C.C.; COSTA, C.; MARGARIA, J.P.; *et al.* Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. **Biochem. J.** 443 (2012), pp. 587 - 601

FERNANDES, C. *et al.* Role of regulatory T cells in irinotecan-induced intestinal mucositis. **Eur J Pharm Sci.** v. 30, n. 115, p. 158-166, 2018.

FRESNO VARA, J. A. *et al.* PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer Treat Rev**, v.30, n. 2, p. 193-204, Apr 2004. ISSN 0305-7372.

FRUMAN, D.A.; CANTLEY, L.C. Idelalisib—a PI3Kdelta inhibitor for B-cell cancers. **N. Engl. J. Med.**, 370 (2014), pp. 1061-1062.

FRUMAN, D.A.; ROMMEL, C. PI3K and câncer: lessons, challenges and opportunities. **Nat Ver Drug Discov.** 2014; 13: 140-156.

FUJITA, K.; KUBOTA, Y.; ISHIDA, H.; SASAKI, Y. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology.** v. 21 (43), p. 12234 – 12248, 2015.

FUKAO, T.; KOYASU, S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol.** 2003 Jul;24(7):358-63. doi: 10.1016/s1471-4906(03)00139-x. PMID: 12860525.

GHIGO, A; DAMILANO, F; BRACCINI, L; HIRSCH, E. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. **Bioessays.** 2010 Mar;32(3):185-96.

GIBSON, R. J., et al. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**, v. 21, p. 313–326, 2013.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer**, v. 14, p. 890–900, 2006.

GIUDICE, F.S.; SQUARIZE, C.H. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. **J Carcinog Mutagen**, 2013.

GONÇALVES, M.D.; HOPKINS, B.D.; CANTLEY, L.D. Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer. **N. Engl. J. Med**, 2018.

GUABIRABA, R.; BESNARD, A.G.; MENEZES, G.B.; SECHER, T.; JABIR, M.S.; AMARAL, S.S.; BRAUN, H.; LIMA-JUNIOR, R.C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; BEYAERT, R.; GRAHAM, G.J.; LIEW, F.Y. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol**. 7(5): 1079-93, 2014.

GULATI, P.; SINGH, N. Evolving possible link between PI3K and NO pathways in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. **Mol Cell Biochem** (2014) 397:255–265 DOI 10.1007/s11010-014-2193-1

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.

HARRIS, S.J.; FOSTER, J.G.; WARD, S.G. PI3K Isoforms as Drug Targets in Inflammatory Diseases: Lessons From Pharmacological and Genetic Strategies. **Curr Opin Investig Drugs**. 2009.

HASSETT, M.J.; O'MALLEY, A.J.; PAKES, J.R.; NEWHOUSE, J.P.; EARLE, C.C. Frequency and cost of chemotherapy-related serious adverse effects in a population sample of women with breast cancer. **J Natl Cancer Inst**. 2006 Aug 16;98(16):1108-17. doi: 10.1093/jnci/djj305. PMID: 16912263.

HAWKINS, P.T.; STEPHENS, L.R. PI3K signalling in inflammation. **Biochim Biophys Acta**. 1851; 2015:882–97.

HERNANDEZ-UNZUETA, I.; BENEDICTO, A.; OLASO, E.; SANZ, E.; VIERA, C.; ARTETA, B.; MÁRQUEZ, J. Ocoxin oral solution® as a complement to irinotecan chemotherapy in the metastatic progression of colorectal cancer to the liver. **Oncology Letters** 13, no. 6: 4002-4012. 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6016>

HIRSCH, E.; KATANAEV, V.L.; GARLANDA, C.; AZZOLINO, O.; PIROLA, L.; SILENGO, L.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A.; ALTRUDA, F.; WYMAN, M.P. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. **Science**. 2000 Feb 11;287(5455):1049-53. doi: 10.1126/science.287.5455.1049. PMID: 10669418.

HOLANDA, R.B.F. Papel de receptores Toll-Like tipo 4 e polimorfismos ASP299GLY e THR399ILE na patogênese da Mucosite Intestinal induzida pelo quimioterápico Irinotecano. Fortaleza; 2018. [**Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Ceará**]

HORIKAWA, Y.; OTAKA, M.; KOMATSU, K.; JIN, M.; ODASHIMA, M.; WADA, I.; MATSUHASHI, T.; OHBA, R.; OYAKE, J.; HATAKEYAMA, N.; DUBOIS, R.N.;

WATANABE, S. MEK activation suppresses CPT11-induced apoptosis in rat intestinal epithelial cells through a COX-2-dependent mechanism. **Dig Dis Sci.** 2007 Oct;52(10):2757-65. doi: 10.1007/s10620-007-9798-0. Epub 2007 Mar 28. PMID: 17393318.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IKUNO, N., *et al.* Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and caecum. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 1876–1883, 1995.

INCA. **Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2020**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. Acesso em: 29 Abr 2020.

JIMENEZ, C.; HERNANDEZ, C.; PIMENTEL, B.; CARRERA, A.C. The p85 regulatory subunit controls sequential activation of phosphoinositide 3-kinase by Tyr kinases and Ras. **J Biol Chem.** 2002 Nov 1;277(44):41556-62. Epub 2002 Aug 23.

JIN, P.; WANG, Y.H.; PENG, Y.G.; HU, S.; LU, Q.; YANG, L.Y. Effect of PI3K/AKT inhibitor on benign prostate hyperplasia and its mechanism: an experimental study. **Zhonghua Nan Ke Xue.** 2010 Dec;16(12):1068-75. Chinese. PMID: 21348195.

KEEFE, D.M.; GIBSON, R.J. Mucosal injury from targeted anti-cancer therapy. **Support Care Cancer**, 15: 483-90, 2007.

KEEFE, D. M. *et al.* Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, v. 109, p. 820–831, 2007.

KOORELLA, C.; NAIR, J.R.; MURRAY, M.E.; CARLSON, L.M.; WATKINS, S.K.; LEE, K.P. Nova regulação da sinalização de fosfatidilinositol 3-cinase induzida por CD80 /

CD86 pela proteína NOTCH1 na produção de interleucina-6 e indoleamina 2,3-dioxigenase por células dendríticas. **J. Biol Chem.** 2014; 289: 7747-7762.

KRISHNA, S. G., et al. Incidence and risk factors for lower alimentary tract mucositis after 1529 courses of chemotherapy in a homogenous population of oncology patients: clinical and research implications. **Cancer**, v. 117, p. 648–655, 2011.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.** 46(3):211-20, 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.

LEE, C.; JEONG, H.; BAE, Y. *et al.* Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based pro-apoptotic peptide. **J. Immunotherapy Cancer** 7, 147 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0610-4>

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.

LI, M.; SALA, V.; DE SANTIS, M.C.; CIMINO, J.; CAPPELLO, P.; PIANCA, N.; DI BONA, A.; MARGARIA, J.P.; MARTINI, M.; LAZZARINI, E.; PIROZZI, F.; ROSSI, L.; FRANCO, I.; BORNBAUM, J.; HEGER, J.; ROHRBACH, S.; PERINO, A.; TOCCHETTI, C.G.; LIMA, B.H.F.; TEIXEIRA, M.M.; PORPORATO, P.E.; SCHULZ, R.; ANGELINI, A.; SANDRI, M.; AMERI, P.; SCIARRETTA, S.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; MONGILLO, M.; ZAGLIA, T.; MORELLO, F.; NOVELLI, F.; HIRSCH, E.; GHIGO, A.

Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth. **Circulation**. 2018 Aug 14;138(7):696-711. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030352. PMID: 29348263.

LIMA-JUNIOR, R.C.; FIGUEIREDO, A.A.; FREITAS, H.C.; *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol**; 69(4):931-42, 2012.

LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; FREITAS, H.C.; WONG, D.V.T.; *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, Y.; REN, Z.; XU, S.; BAI, H.; MA, N.; WANG, F. Low-dose-intensity bevacizumab with weekly irinotecan for platinum- and taxanes-resistant epithelial ovarian cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2015; 75(3): 645–651.

LOUPAKIS, F.; CREMOLINI, C.; MAIS, G.; LONARDI, S.; ZAGONEL, V.; SALVATORE, L.; CORTESI, E.; TOMASELLO, G.; RONZONI, M.; SPADI, R.; ZANIBONI, A.; TONINI, G.; BUONADONNA, A.; AMOROSO, D.; CHIARA, S.; CARLOMAGNO, C.; BONI, C.; ALLEGRINI, G.; BONI, L.; FALCONE, A. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. **N Engl J Med**. 2014 Oct 23;371(17):1609-18. doi: 10.1056/NEJMoa1403108. PMID: 25337750.

MACPHERSON, B. R.; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion**, v. 17, p.135-150, 1978.

MARCOLINO ASSIS-JÚNIOR, E.; MELO, A.T.; PEREIRA, V.B.M.; WONG, D.V.T.; SOUSA, N.R.P.; OLIVEIRA, C.M.G.; MALVEIRA, L.R.C.; MOREIRA, L.S.; SOUZA, M.H.L.P.; ALMEIDA, P.R.C.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P. Dual effect of silymarin on

experimental non-alcoholic steatohepatitis induced by irinotecan. **Toxicol Appl Pharmacol.** V. 327, p. 71-79, 2017.

MARLEY, A.R.; NAN, H. Epidemiology of colorectal cancer. **Int J Mol Epidemiol Genet.** 2016; 7(3): 105–114.

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.

MARTUCCI, C.; CAPELLI, A.M.; BERTOLINI, S.; FIONI, A.; BIAGETTI, M.; RONCHI, P.; CAPACCHI, S.; MILEO, V.; GALLO, P.; MIGLIETTA, D.; VILLETTI, G.; CIVELLI, M. CHD-053012, a Novel Inhaled PI3K Delta Inhibitor: Anti-Inflammatory Profile in a Rodent Model of Lung Inflammation. C60. **Asthma: Cellular and Animal Models.** May 1, 2020, A5614-A5614

MATHIJSSSEN, R. H. J. *et al.* Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 21, p. 1585-1592, 2004.

MAYO, B. J., STRINGER, A. M., BOWEN, J. M., *et al.* Irinotecan-induced mucositis: the interactions and potential role of GLP-2 analogues. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, 2017. 79(2), 233-249.

MEDINA-TATO, D.A.; WARD, S.G.; WATSON, M.L. Phosphoinositide 3-kinase signalling in lung disease: leucocytes and beyond. **Immunology.** 2007 Aug;121(4):448-61. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02663.x. PMID: 17614878; PMCID: PMC2265972.

MELO, M.L.; BRITO, G.A.; SOARES, R.C.; CARVALHO, S.B.; SILVA, J.V.; SOARES, P.M.; VALE, M.L.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. 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 Chemother Pharmacol**; 61(5):775-84. 2008.

MERKENSCHLAGER, M.; von BOEHMER, H. PI3 kinase signalling blocks Foxp3 expression by sequestering Foxo factors. **J Exp Med**. 2010 Jul 5;207(7):1347-50. doi: 10.1084/jem.20101156. PMID: 20603315; PMCID: PMC2901062.

MOILANEN, L.J.; HÄMÄLÄINEN, M.; LEHTIMÄKI, L.; NIEMINEN, R.M.; MOILANEN, E. Urate Crystal Induced Inflammation and Joint Pain Are Reduced in Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Deficient Mice – Potential Role for Transient Receptor Potential Ankyrin 1 in Gout. **Plos One**. 2015. 10(2): e0117770.

MUKOHARA, T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. **Breast Cancer (Dove Med Press)**. 2015 May 15; 7:111-23. doi: 10.2147/BCTT.S60696.

NEWSLAB. OMS alerta que incidência de câncer deve aumentar mais de 80% até 2040. Disponível em: <https://newslab.com.br/oms-alerta-que-incidencia-de-cancer-deve-aumentar-mais-de-80-ate-2040/>. Acesso em: 22 Abr 2020

O'DONNELL, J.S.; MASSI, D.; TENG, M.W.L.; MANDALA, M. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. **Seminars in Cancer Biology**. Volume 48, February 2018, Pages 91-103.

O'ROURKE, J.; LEE, A.; MCNEILL, J. Differences in the gastrointestinal microbiota of specific pathogen free mice: an often unknown variable in biomedical research. **Lab Anim**. 1988 Oct;22(4):297-303. doi: 10.1258/002367788780746142. PMID: 2976437.

OJANIEMI, M.; GLUMOFF, V.; HARJU, K.; LILJEROOS, M.; VUORI, K.; HALLMAN, M. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. **Eur J Immunol**. 2003 Mar;33(3):597-605

OKKENHAUG, K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. **Annu Rev Immunol**. 2013; 31:675–704.

OMENETTI, S.; PIZARRO, T.T. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. **Front Immunol**. 17; 6:639, 2015

ONCONEWS. **ANVISA aprova Alpelisibe no câncer de mama avançado ou metastático.** Disponível em:

<https://www.onconews.com.br/site/noticias/noticias/ultimas/4394-anvisa-aprova-alpelisibe-no-c%C3%A2ncer-de-mama-avan%C3%A7ado-ou-metast%C3%A1tico.html>. Acesso em: 01 Mai 2020.

PADDOCK, M.N.; FIELD, S.J.; CANTLEY, L.C. Treating cancer with phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors: increasing efficacy and overcoming resistance. **The Journal of Lipid Research**. 2019. doi: 10.1194/jlr.S092130.

PAPADATOS-PASTOS, D.; RABBIE, R.; ROSS, P.; SARKE, D. The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. **Crit Rev Oncol/Hematol**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2014.12.006>

PEREIRA, V.B.; MELO, A.T.; ASSIS-JÚNIOR, E.M.; WONG, D.V.; BRITO, G.A.; ALMEIDA, P.R.; RIBEIRO, R.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**. Feb;77(2):323-32. doi: 10.1007/s00280-015-2938-x. Epub 2015 Dec 14, 2016

PETERSON, D.E.; BENSADOUN, R.J.; ROILA, F. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO clinical practice guidelines. **Ann Oncol**, v.22, p.78–84, 2011.

PETRELLI, F.; INNO, A.; GHIDINI, A.; RIMASSA, L.; TOMASELLO, G.; LABIANCA, R.; BARNI, S.; GISCAD (Gruppo Italiano per lo Studio dei Carcinomi dell'Apparato Digerente) and Cremona Hospital. Second line with oxaliplatin- or irinotecan-based chemotherapy for gemcitabinepretreated pancreatic cancer: A systematic review. **Eur J Cancer**. Aug; 81:174-182, 2017.

PLANTS FOR THE FUTURE - PFAF. **Camptotheca acuminata - Decne**. Disponível em: <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Camptotheca+acuminata>. Acesso em: 22 Set 2020.

PORTA, P.C.; PAGLINO, C.; MOSCA, A. Targeting PI3K/AKT/mTOR signaling in cancer. **Frontiers oncology**, 2014; (4): 64-75.

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.

RIVORY, L.P. Conversion of irinotecan to its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. **Biochem.Pharmacol.** v. 52, n. 7, p. 1103-11, 1996.

ROY, U.; GÁLVEZ, E.J.C.; ILJAZOVIC, A.; LESKER, T.R.; BŁAŻEJEWSKI, A.J.; PILS, M.C.; HEISE, U.; HUBER, S.; FLAVELL, R.A.; STROWIG, T. Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells. **Cell Rep**. 2017 Oct 24;21(4):994-1008. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.097. PMID: 29069606; PMCID: PMC5668567.

SALMON, S. E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia do câncer. In: KATZUNG, B. G. (Ed.) **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2014. cap. 54, p. 949-975.

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.

SCHINK, K.O.; RAIBORG, C.; STENMARK, H. Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. **Bioessays**, 35 (2013), pp. 900-912

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

SEDLAK, J; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**. 1968 Oct 24;25(1):192-205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-4. PMID: 4973948.

SEIBEL, F.E.R. Receptores de Estrogênio e Vias de Sinalização MAPk E PI3K em Hiperplasia Prostática Benigna e Câncer de Próstata. Porto Alegre; 2014. [Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul].

SELLECKCHEM. **Nemiralisibe (GSK2269557)**. Atualizado em 14 Out 2019. Disponível em: <https://www.selleckchem.com/products/gsk2269557.html>. Acesso em: 03 Mai 2020

SHIMAZU, R.; AKASHI, S.; OGATA, H.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; MIYAKE, K.; KIMOTO, M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J Exp Med**. 189(11):1777-82, 1999.

SILVA, M; ERRANTE, P.R. Câncer colorretal: Fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**. v. 13, n. 33, out./dez.2016 ISSN 2318-2083.

SÔNEGO, F.; CASTANHEIRA, F. V. S; FERREIRA, R. G.; KANASHIRO, A.; LEITE, C. A. V. G.; NASCIMENTO, D. C.; COLÓN, D. F.; BORGES, V. F.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F.Q. Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016. DOI:10.3389/fimmu.2016.00155. ISSN:1664-3224.

SONIS, S. T. *et al.* Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, suppl. 9, p. 1995-2025, 2004.

SONIS, S.T.; FAY, E.G. Oral complications of câncer therapy. **Oncology**., v.16, p. 680-686, 2002.

STARK, A.K.; SRISKANTHARAJAH, S.; HESSEL, E.M.; OKKENHAUG, K. PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. **Curr Opin Pharmacol**. 2015 Aug; 23: 82–91.

STEINBACH, E.C.; KOBAYASHI, T.; RUSSO, S.M.; SHEIKH, S.Z.; GIPSON, G.R.; KENNEDY, S.T.; UNO, J.K.; MISHIMA, Y.; BORST, L.B.; LIU, B.; HERFARTH, H.; TING, J.P.Y.; SARTOR, R.B.; PLEVY, S.E. Innate PI3K p110 δ regulates Th1/Th17 development and microbiota-dependent colitis. **J Immunol**. 2014 April 15; 192(8): 3958–3968. doi:10.4049/jimmunol.1301533

TAKASUNA, K. *et al.* Involvement of β -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative Irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res.**, v. 56, p. 3752-3757, 1996.

TALLMAN, M.N.; RITTER, J.K.; SMITH, P.C. Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. **Drug Metab Dispos.** v.33, n.7, p.977-983, 2005.

TARTEY, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. **Int Rev Immunol.** 2017 Mar 4;36(2):57-73. doi: 10.1080/08830185.2016.1261318. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28060562.

TEIXEIRA, M. A. Papel de receptores CXCR2 na mucosite intestinal induzida por irinotecano. Fortaleza; 2015. [**Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará**].

THORPE, D.; BUTLER, R.; SULTANI, M.; VANHOECKE, B.; STRINGER, A. Irinotecan-Induced Mucositis Is Associated with Goblet Cell Dysregulation and Neural Cell Damage in a Tumour Bearing DA Rat Model. **Pathology & Oncology Research.** 2019. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00644-x>

TWELVES, C.; JOVE, M.; GOMBOS, A.; AWADA, A. Cytotoxic chemotherapy: Still the mainstay of clinical practice for all subtypes metastatic breast cancer. **Crit Rev Oncol Hematol.** Apr; 100:74-87, 2016.

VANHAESEBROECK, B.; WELHAM, M.J.; KOTANI, K.; STEIN, R.; WARNE, P.H.; ZVELEBIL, M.J.; HIGASHI, K.; VOLINIA, S.; DOWNWARD, J.; WATERFIELD, M.D. p110 δ , a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1997 Apr 29; 94(9): 4330–4335.

VANHAESEBROECK, B; WHITEHEAD, M.A.; PIÑEIRO, R. Molecules in medicine mini-review: isoforms of PI3K in biology and disease. **J Mol Med (Berl).**;94(1):5-11, 2016.

XENOU, L.; PAPAKONSTANTI, E. A. P110δ PI3K as a therapeutic target of solid tumours. **Clin Sci** (Lond) 26 June 2020; 134 (12): 1377–1397.

XIE, R. *et al.* Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 72, n. 3, p. 265-75, 2002.

WAGNER, A.D.; SYN, N.L.; MOEHLER, M.; GROTHE, W.; YONG, W.P.; TAI, B.C.; HO, J.; UNVERZAGT, S. Chemotherapy for advanced gastric cancer. **Cochrane Database Syst Rev.** 29;8:CD004064, 2017.

WARDILL, H.R.; BOWEN, J.M.; AL-DASOOQI, N.; SULTANI, M.; BATEMAN, E.; STANSBOROUGH, R.; SHIRREN, J.; GIBSON, R.J. Irinotecan disrupts tight junction proteins within the gut: Implications for chemotherapy-induced gut toxicity. **Cancer Biol Ther.** 2014 Feb 1; 15(2): 236–244.

WHITMAN, M., DOWNES, C., KEELER, M. *et al.* Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. **Nature** **332**, 644–646 (1988). <https://doi.org/10.1038/332644a0>

WONG, D.V.T. Mediação dos Receptores TLR2 e NOD1, e da proteína adaptadora MyD88 na modulação da mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano. Fortaleza; 2013. [Tese de Doutorado - Universidade Federal do Ceará].

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.

WONG, D.V.T.; RIBEIRO-FILHO, H.V.; WANDERLEY, C.W.S.; LEITE, C.A.V.G.; LIMA, J.B.; ASSEF, A.N.B.; CAJADO, A.G.; BATISTA, G.L.P.; GONZÁLEZ, R.H.; SILVA, K.O.; BORGES, L.P.C.; ALENCAR, N.M.N.; WILKE, D.V.; CUNHA, T.M.;

FIGUEIRA, A.C.M.; CUNHA, F.Q.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P. SN-38, the active metabolite of irinotecan, inhibits the acute inflammatory response by targeting toll-like receptor 4. **Cancer Chemother Pharmacol.** 2019 Aug;84(2):287-298. doi: 10.1007/s00280-019-03844-z. Epub 2019 Apr 22.

YANG XQ, LI CY, XU MF, ZHAO H, WANG D. Comparison of first-line chemotherapy based on irinotecan or other drugs to treat non-small cell lung cancer in stage IIIB/IV: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer.** 16;15:949, 2015.

YANG, J.; NIE, J.; MA, X.; WEI, Y.; PENG, Y.; WEI, X. Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. **Molecular Cancer**, 2019. V.18, n. 26.

YUAN, T.L.; CANTLEY, L.C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene** 2008; 27:5497–510.

ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da interação entre receptores semelhantes ao Toll (TLR) e fosfatidilinositóis-3 quisase de classe I na regulação da imunidade inata e adaptativa na mucosite intestinal", protocolada sob o CEUA nº 5132240718 (ID 000837), sob a responsabilidade de **Roberto César Pereira Lima-Júnior** e equipe; *Deysi Viviana Tenazoa Wong*; *Aurilene Gomes Cajado* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 12/03/2019.

We certify that the proposal "The study of the interaction between toll-like receptors (TLR) and class I phosphoinositide 3-kinases in the regulation of innate and adaptive immunity during intestinal mucositis", utilizing 228 Isogenics mice (228 males), protocol number CEUA 5132240718 (ID 000837), under the responsibility of **Roberto César Pereira Lima-Júnior** and team; *Deysi Viviana Tenazoa Wong*; *Aurilene Gomes Cajado* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/12/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **12/2022**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 5 semanas**

N: **228**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **18 a 24 g**

Local do experimento: Os animais oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará serão mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e a experimentação final será realizada no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer localizado no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos.

Fortaleza, 28 de março de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

ANEXO 2



TLR4 gene polymorphisms (rs4986790, rs4986791) in patients and Tlr4 gene deficiency in mice enhance the severity of irinotecan-related diarrhea

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>British Journal of Pharmacology</i> |
| Manuscript ID | 2020-BJP-1255-RP.R1 |
| Manuscript Type: | Research Paper |
| Date Submitted by the Author: | 21-Mar-2021 |
| Complete List of Authors: | <p>Wong, Deysi; Federal University of Ceará, Pathology and Forensic Medicine; Haroldo Juaçaba Hospital, Laboratory of Molecular Biology and Genetics</p> <p>Holanda, Renata; Federal University of Ceará, Department of Pharmacy</p> <p>Cajado, Aurilene; Federal University of Ceará, Physiology and Pharmacology</p> <p>Bandeira, Alessandro; Federal University of Ceará, Physiology and Pharmacology</p> <p>Pereira, Jorge; Federal University of Ceará, Physiology and Pharmacology</p> <p>Amorim, Joice; Haroldo Juaçaba Hospital, Laboratory of Molecular Biology and Genetics</p> <p>Torres, Clarice; Federal University of Ceará, Physiology and Pharmacology</p> <p>Ferreira, Luana; Federal University of Ceará, Physiology and Pharmacology</p> <p>Lopes, Marina; Federal University of Ceará, Pathology and Forensic Medicine</p> <p>Oliveira, Roberta; Center for Research and Drug Development (NPDM)</p> <p>Pereira, Anamaria; Federal University of Ceara</p> <p>Sant'Ana, Rosane; Haroldo Juaçaba Hospital, Clinical Oncology Service; Haroldo Juaçaba Hospital, Laboratory of Molecular Biology and Genetics</p> <p>Arruda, Larissa; Haroldo Juaçaba Hospital, Clinical Oncology Service</p> <p>Ribeiro-Júnior, Howard; Center for Research and Drug Development (NPDM)</p> <p>Pinheiro, Ronald; Center for Research and Drug Development (NPDM)</p> <p>Almeida, Paulo ; Federal University of Ceará, Pathology and Forensic Medicine</p> <p>Carvalho, Robson; São Paulo State University, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences</p> <p>Chaves, Fabio; Haroldo Juaçaba Hospital, Clinical Oncology Service</p> <p>Rocha-Filho, Duilio; Walter Cantidio University Hospital, Clinical Oncology Service</p> <p>Cunha, Fernando; School of Medicine of Ribeirão Preto, Pharmacology</p> <p>Lima-Júnior, Roberto; Federal University of Ceará, Physiology and Pharmacology</p> |
| Major area of pharmacology: | Cancer Pharmacology |

ANEXO 3



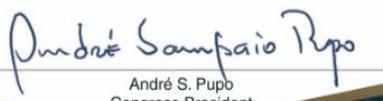
51st Brazilian Congress of
Pharmacology and
Experimental Therapeutics

Certificate

Marina Helena da Silva Lopes

has participated in the 51st Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics,
from September 24-27, 2019 at Maceió Convention Center, attending the following activities:

- Participant
- Poster presentation - 10.019 Gene expression profile as predictive response markers to neoadjuvant anastrozole in elderly women diagnosed with breast cancer. Lopes MHS1, Barbosa LA2, Torrezan GT3, Olivieri EHR3, Paula CAA3, Gifoni MAC2, Lima MVA2, Carraro DM3, Wong DVT1, Andrade VP3 1UFC, 2ICC, 3AC Camargo Cancer Center



André S. Pupo
Congress President



Ruth Cardoso Convention Center
September 24-27, 2019
Maceió, AL

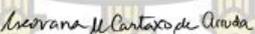
ANEXO 4

Universidade Federal do Ceará
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Encontros Universitários 2019

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho 'O PAPEL DA ENZIMA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASE (PI3K) DELTA NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO' do(s) autor(es) JHONATA LIMA ROCHA, MARINA HELENA DA SILVA LOPES, ALESSANDRO MAIA BANDEIRA, AURILENE GOMES CAJADO e LIVIA MARIA SOARES NOBRE foi apresentado no XXXVIII Encontro de Iniciação Científica realizado no período de 20 a 22 de Maio de 2020.

Fortaleza, 31 de Agosto de 2020

| | | |
|--|---|---|
|  Jorge Herbert Soares de Lira Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação |  Geovana Maria Cartaxo de Arruda Freire Coordenadora Geral dos EU2019 |  Geanne Mátos de Andrade Coordenadora de Pesquisa |
|--|---|---|