



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

AURILENE GOMES CAJADO

**O BLOQUEIO DE PI3K γ ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA-CE

2024

AURILENE GOMES CAJADO

**O BLOQUEIO DE PI3K γ ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior

Coorientadora:

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

FORTALEZA-CE

2024

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)

- C139b Cajado, Aurilene Gomes.
O bloqueio de PI3Ky atenua a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camudongos / Aurilene Gomes Cajado. – 2024.
93 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior.
Coorientação: Prof. Dr. Deysi Viviana Tenazoa Wong.
1. Quimioterapia. 2. Toxicidade. 3. Mucosite. 4. Inflamação. 5. Camudongos. I. Título.
CDD 615.1
-

AURILENE GOMES CAJADO

O BLOQUEIO DE PI3K γ ATENUA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 05.07.2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Deysi Viviana Tenazoa Wong
Universidade Federal do Ceará – UFC

Fernando de Queiroz Cunha
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – FMRP/USP

Helano Carioca Freitas
AC Camargo Câncer Center, São Paulo

Luísa Mota da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Às mulheres aguerridas que me impulsionaram a seguir meus sonhos.
Dedico às minhas mães (Ângela, Maria, Socorro, Luciene, Anete),
pelo apoio genuíno e amoroso.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio da Universidade Federal do Ceará- UFC, do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos- NPDM, do Biotério Setorial do Campus do Porangabuçu “Prof. Eduardo Torres”, dos órgãos de fomento FUNCAP, CNPq e, principalmente, à CAPES pela concessão da bolsa.

De forma muito especial, quero agradecer ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer- LAFICA por representar, para mim, mais que um laboratório de pesquisa, uma ideia, um sentimento que me faz acreditar que consigo fazer pesquisa científica de qualidade e que me ajudou a construir quem sou hoje.

Agradeço ao meu orientador prof. Dr. Roberto César por tantos ensinamentos, apoio e estímulo. Em cada conversa, por mais informal que fosse, ele sempre contribuiu para que eu despertasse um novo olhar sobre pesquisa e formação pessoal. Obrigada, professor Roberto, por ter me ajudado a construir e conquistar tantas vitórias na minha formação. Eu jamais teria conseguido sem sua orientação. O senhor mudou minha vida e sempre terá minha gratidão e admiração.

Quero, muito carinhosamente, agradecer minha professora e coorientadora Deysi Wong que contribuiu de forma imprescindível em cada progresso meu no laboratório. Obrigada pelo apoio, pela confiança, pelas sessões de terapia sempre que eu me sentia insegura. Profa. Deysi, tenho um enorme carinho e me sinto privilegiada por ter convivido esses anos com a senhora, que é uma referência para mim.

Obrigada aos professores que aceitaram participar das bancas de qualificação, Prof. Delano Marinho, Prof. Marco Clementino e Prof. Diego Wilke, e de defesa, Prof Fernando Cunha, prof Helano Carioca, Profa Luísa Mota; Prof Pedro Magalhães, por terem dedicado parte do seu tempo na leitura e na sugestão de melhorias para o aprimoramento deste trabalho.

Além destes, durante o processo de construção da tese tive a felicidade de conviver com pessoas maravilhosas e gostaria de agradecer a cada uma, especialmente:

À Gisele Pinheiro que é uma parceira e amiga incrível. Obrigada por me ensinar o modelo animal, os protocolos experimentais e por ter sido um apoio no processo seletivo que permitiu meu ingresso no programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Mais do que parceiras de laboratório, temos uma amizade sólida e, com certeza, todo esse processo foi muito mais gratificante por ter você comigo.

À Anamaria Falcão por ter me ensinado a fazer imunofluorescência, por ter me ajudado a construir a figura de conclusão da tese e por ter me concedido o título de tia do Vitor. Amiga, você é muito especial para mim, obrigada pela amizade e pelos conselhos.

À Celia Choquenaira por me ensinar Western Blotting, pelos conselhos, pela amizade e, claro, pelos ensinamentos de espanhol e da cultura peruana. Com certeza de ter me tornado uma versão melhor depois do convívio com você.

À Lízias Quintela por toda vivência compartilhada de laboratório. Obrigada pela parceria e por sua amizade que sem dúvidas será para a vida toda.

À Gisely Lima, Renata Rocha, Mariana Coelho e Mariana Guimarães pelo convívio e a parceria de laboratório. Vocês são amigas muito queridas.

À Kayanne Ferreira por ter me ajudado na cultura de células, pela amizade e parceria.

Aos integrantes do LAFICA que, sem dúvidas, contribuíram para minha formação de diversas formas.

Às demais Professoras do LAFICA, Profa. Mariana Vale, Profa. Delane Viana e, especialmente, à Profa. Nylane Alencar, do Laboratório de Bioquímica, que sempre foi muito atenciosa e gentil comigo. Agradeço pelos ensinamentos e a confiança.

Aos pesquisadores externos com os quais tive o privilégio de interagir e, também, de aprender em diversos projetos de pesquisa desenvolvidos conjuntamente ao longo desses anos. Também, gostaria de agradecer à Profa. Ana Paula Negreiros pelas análises de histologia.

Quero agradecer, ainda, aos servidores da UFC: Dona Ivoneide, Manoel Serrazul, Wesley, Sr. Moreira, Sr. Haroldo, Deomar e aos que trabalham no NPDM que durante esses anos foram muito gentis e solícitos em ajudar.

Tudo só foi possível pelo apoio genuíno da minha família a quem agradeço com muito amor.

Ao começo e ao fim de tudo na minha vida, agradeço a Deus, Nossa Senhora e ao meu anjo da guarda.

*“Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces.
Recomeça.”*
Cora Coralina

RESUMO

Introdução: A mucosite é uma toxicidade comum no tratamento oncológico à base de irinotecano (IRI). Estima-se que pacientes com quadro de mucosite tem o dobro de risco de infecções, elevando o risco de morte em até quatro vezes. A fosfatidoinositol-3-quinase gama (PI3K γ) é amplamente expressa em leucócitos e sua inibição tem sido considerada uma estratégia terapêutica promissora para o controle de distúrbios inflamatórios e autoimunes.

Objetivo: Avaliar o papel da PI3K γ no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano e testar o potencial efeito sinérgico antitumoral entre irinotecano e AS-605240, um inibidor seletivo de PI3K γ .

Métodos: Camundongos machos C57BL/6 (20-22g, n=6-9/grupo) receberam veículo, IRI (120 mg/Kg, uma injeção/dia/quatro dias, i.p.) sozinho ou combinado com AS-605240 (10 mg/kg, v.o.). No sétimo dia após a primeira dose de IRI, determinou-se a gravidade da diarreia. Após a eutanásia dos animais, coletou-se o íleo para morfometria, expressão dos genes *Tlr2*, *4* e *9*, *Aim2*, assim como alvos que caracterizam o perfil de polarização de células T como *Tgfb*, *Cxcl1*, *Il12b*, *Ifng*, *Il33*, *Il4*. Avaliaram-se, também, os níveis de citocinas IL1- β e IL-6 e a expressão de pAKT, FOXP3 e F4/80 por imunofluorescência. Realizou-se, ainda, a dosagem de malondialdeído (MDA), glutathiona (NP-SH), mieloperoxidase (MPO) e a contagem de células calciformes coradas com Alcian Blue e PAS. Para a avaliação do efeito sinérgico entre irinotecano e AS-605240, verificou-se o efeito antitumoral (células Mc-38, 1×10^6 células, na região axilar) após sete dias de tratamento.

Protocolo de aprovação do estudo: CEUA N°5132240718.

Resultados: A inibição da PI3K γ atenuou as alterações morfométricas ao melhorar a relação vilo/cripta e reduzir os escores histopatológicos (1[1-2]) vs. o grupo IRI (2[1-2]). Além disso, houve modulação da resposta inflamatória pela redução da expressão de *Tlr 2*, *4*, *9* e da proteína AKT fosforilada no grupo tratado com AS-605240. A participação da resposta Treg no grupo IRI foi evidenciada pelo aumento de *Tgfb* (em até 65 vezes) e de FOXP3 (4% de área de fluorescência) versus o grupo veículo. Os alvos da resposta Th17 também aumentaram no grupo IRI, incluindo IL-6 (57,72 \pm 8,4 vs 39,09 \pm 3,8) e *Cxcl1* (em 9,8 vezes) promovendo o aumento da migração de neutrófilos (4242 \pm 1187), produção de MDA (12,46 \pm 1,23) e redução dos NP-SH (421,4 \pm 44,13) comparado ao grupo veículo (876,4 \pm 81; 5,057 \pm 0,97; 568,3 \pm 24,4 respectivamente). Notavelmente, o tratamento com AS-605240 reverteu esses parâmetros ao reduzir *Tgfb* (22,3 \pm 4,1), FOXP3 (2,17%), IL-6 (23,6 \pm 3,1), *Cxcl1* (1,2 \pm 0,8), MPO (1436 \pm 268), MDA (6,4 \pm 1,0) e manter os níveis de NP-SH (563,6 \pm 38,89). Além disso, o AS-605240 diminuiu F4/80 (2,18% da área de fluorescência) e os níveis de IL-1 β (em média 30,25 pg/mg) comparado ao IRI. Contudo, a expressão de *Il12b* e *Ifng* não foram alterados entre esses grupos. Finalmente, verificamos que o AS-605240 não alterou os níveis de *Il33* (49,9 \pm 9,9), mas aumentou *Il4* (4,5 \pm 1,3) vs. grupo IRI (*Il33*: 44,9 \pm 7,7; *Il4*: 0,7 \pm 0,1). Adicionalmente, o AS-605240 aumentou a quantidade de células calciformes ácidas versus o grupo IRI (10,5 \pm 4,6 vs. 8,7 \pm 0,6) e neutras (14,3 \pm 0,6 vs. 8,3 \pm 0,7) sugerindo a participação de células Th2 na produção de muco intestinal. Em conjunto, essas alterações promovidas pela inibição de PI3K γ contribuíram para atenuar a gravidade da diarreia versus o grupo IRI (AS-605240: 1[1-2] vs. IRI: 2[1-3]). Finalmente, a combinação farmacológica do AS-605240 com o IRI não potencializou a inibição do crescimento tumoral no ensaio *in vivo*.

Conclusão: A inibição da PI3K γ atenuou o dano intestinal ao modular a resposta inflamatória para um perfil de resposta linfocitária Th2, reduzindo a gravidade da diarreia e contribuindo para o aumento do número de células calciformes e proteção intestinal sem comprometer o efeito antineoplásico do irinotecano.

Palavras-chave: Quimioterapia. Toxicidade. Mucosite. Inflamação. Camundongos.

THE BLOCKADE OF PI3K γ ATTENUATES INTESTINAL MUCOSITIS-INDUCED IRINOTECAN IN MICE

Introduction: Mucositis is a common toxicity in cancer treatment involving irinotecan (IRI). Patients with mucositis have double the risk of infections, increasing four-fold the risk of death. Phosphatidylinositol-3-kinase gamma (PI3K γ) is widely expressed in leukocytes, and its inhibition has been considered a promising therapeutic strategy for the control of inflammatory and autoimmune disorders. **Objective:** To evaluate the role of PI3K γ in an irinotecan-induced intestinal mucositis model and to test the potential synergistic antitumor effect between irinotecan and AS-605240, a selective PI3K γ inhibitor. **Methods:** Male C57BL/6 mice (20-22g, n=6-9/group) received a vehicle, IRI (120 mg/kg, one injection/day/four days, i.p.) alone, or combined with AS-605240 (10 mg/kg, p.o.). On the seventh day after the first IRI dose, the severity of diarrhea was determined. After euthanasia, the ileum was collected for morphometry, gene expression analysis of *Tlr2*, *4*, and *9*, *Aim2*, as well as targets characterizing the T cell polarization profile such as *Tgfb*, *Cxcl1*, *Il12b*, *Ifng*, *Il33*, and *Il4*. Cytokine levels (IL1- β and IL-6), and the expression of pAKT, FOXP3, and F4/80 by immunofluorescence were also assessed. Additionally, malondialdehyde (MDA), glutathione (NP-SH), myeloperoxidase (MPO) levels, and the count of goblet cells stained with Alcian Blue and PAS were measured. To evaluate the synergistic effect between irinotecan and AS-605240, the antitumor effect (Mc-38 cells, 1×10^6 cells, in the axillary region) was assessed after seven days of treatment. Study approval protocol: CEUA N $^{\circ}$ 5132240718. **Results:** PI3K γ inhibition attenuated morphometric changes by improving the villus/crypt ratio and reducing histopathological scores (1[1-2]) vs. the IRI group (2[1-2]). Additionally, there was modulation of the inflammatory response by reducing the expression of *Tlr 2*, *4*, *9*, and phosphorylated AKT protein in the AS-605240 treated group. The involvement of the Treg response in the IRI group was evidenced by increased *Tgfb* (up to 65-fold) and FOXP3 (4% fluorescence area) compared to the vehicle group. Th17 response targets also increased in the IRI group, including IL-6 (57.72 \pm 8.4 vs 39.09 \pm 3.8) and *Cxcl1* (9.8-fold), promoting increased neutrophil migration (4242 \pm 1187), MDA production (12.46 \pm 1.23), and reduced NP-SH (421.4 \pm 44.13) compared to the vehicle group (876.4 \pm 81; 5.057 \pm 0.97; 568.3 \pm 24.4, respectively). Notably, AS-605240 treatment reversed these parameters by reducing *Tgfb* (22.3 \pm 4.1), FOXP3 (2.17%), IL-6 (23.6 \pm 3.1), *Cxcl1* (1.2 \pm 0.8), MPO (1436 \pm 268), MDA (6.4 \pm 1.0), and maintaining NP-SH levels (563.6 \pm 38.89). Furthermore, AS-605240 decreased F4/80 (2.18% fluorescence area) and IL-1 β levels (average 30.25 pg/mg) compared to IRI. However, *Il12b* and *Ifng* expression did not change between these groups. Finally, we found that AS-605240 did not alter *Il33* levels (49.9 \pm 9.9) but increased *Il4* (4.5 \pm 1.3) vs. the IRI group (*Il33*: 44.9 \pm 7.7; *Il4*: 0.7 \pm 0.1). Additionally, AS-605240 increased the number of acidic goblet cells vs. the IRI group (10.5 \pm 4.6 vs. 8.7 \pm 0.6) and neutral cells (14.3 \pm 0.6 vs. 8.3 \pm 0.7), suggesting the involvement of Th2 cells in intestinal mucus production. Together, these changes promoted by PI3K γ inhibition contributed to attenuating diarrhea severity vs. the IRI group (AS-605240: 1[1-2] vs. IRI: 2[1-3]). Finally, the pharmacological combination of AS-605240 with IRI did not potentiate tumor growth inhibition in the *in vivo* assay. **Conclusion:** PI3K γ inhibition attenuated intestinal damage by modulating the inflammatory response towards a Th2 lymphocyte profile, reducing diarrhea severity, and contributing to increased goblet cell numbers and intestinal protection without compromising the antineoplastic effect of irinotecan.

Keywords: Chemotherapy. Toxicity. Mucositis. Inflammation. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Patobiologia da mucosite oral/intestinal decorrente do tratamento oncológico.	23
Figura 2: Aspectos gerais da camptotecina e derivados.	26
Figura 3: Metabolismo e excreção do irinotecano.	29
Figura 4: Modelo hipotético da mucosite intestinal induzida por irinotecano durante o tratamento oncológico.	32
Figura 5: Via de sinalização das PI3K de classe I.	37
Figura 6: O domínio catalítico da p110 γ é o sítio de ligação de inibidores como IPI-549 e AS-605240.	39
Figura 7: Protocolos experimentais desenvolvidos para o modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos C57BL/6.	47
Figura 8: A mucosite intestinal induzida por irinotecano aumenta a expressão de intermediários da via PI3K/AKT/mTOR.	56
Figura 9: O inibidor de PI3K γ (AS-605240) atenua alterações morfométricas no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano.	57
Figura 10: O inibidor de PI3K γ atenua o dano intestinal reduzindo a expressão de receptores do tipo Toll-like.	58
Figura 11: O inibidor de PI3K γ reduz AKT fosforilado.	59
Figura 12: A inibição de PI3K γ reduz a expressão de FOXP3 e Tgfb.	60
Figura 13: A redução de IL-6 e Cxcl1 no grupo AS-605240 reduz a migração de neutrófilos e o estresse oxidativo.	61
Figura 14: A migração de macrófagos e os níveis de IL-1 β são reduzidos no tratamento com o inibidor de PI3K γ	62
Figura 15: O inibidor de PI3K γ aumenta a expressão de citocinas que promovem o perfil Th2, aumentando o número de células caliciformes.	63
Figura 16: A inibição de PI3K γ atenua parcialmente a lesão intestinal, detectado pelos escores de diarreia mais leves.	64
Figura 17: A inibição de PI3K γ não interfere na perda de massa corporal ou no perfil mielotóxico induzido por irinotecano.	65
Figura 18: O inibidor de PI3K γ não compromete o efeito anticancerígeno do irinotecano.	65
Figura 19: A inibição de PI3K γ pelo AS-605240 atenua o dano intestinal no modelo de mucosite induzido por irinotecano.	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Comparação dos principais critérios usados para terminologia dos eventos adversos.	24
Tabela 2: Principais características das isoformas de PI3K.	35
Tabela 3: Sequência/Identificação dos alvos usados na análise de expressão genica por qRT-PCR.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

5-FU	5 -Fluorouacila
ABC	Família de transportadores ATP Binding Cassete
AKT	Proteína quinase B
AMI2	Ausente no melanoma 2
ANOVA	Análise de variância
APC	Ácido aminopentano carboxílico
AS-605240	5-(6-quinoxalinilmetileno)-2,4-tiazolidinediona
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BAD	Agonista de morte celular associado a BCL2
Bcl-xL	Linfoma de células B-extra grande
BES	Butirilcolinesterase
B-gluc	β -Glucuronidase
BSA	Albumina Sérica Bovina
C57BL/6	Camudongos <i>Imbred</i> da espécie C57BL/6
CD4+	Célula T auxiliar
CD8+	Célula T citotóxica
CDC42	Proteína do ciclo de divisão celular 42
cDNA	DNA complementar
CES	Carboxilesterases
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cox-2	Cicloxigenase 2
CpG	Dinucleotídeo citosina/fósforo/guanina
Ct	Limiar do ciclo (<i>Cycle threshold</i>)
CT26	Linhagem de carcinoma colorretal murino
CTCAE	Critérios terminológicos comuns para eventos adversos
CXCL1	Quimiocina (motivo C-X-C) ligante 1
CYP	Citocromo P450
DAMPS	Padrões moleculares associados a danos
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de fita dupla
DSS	Dextran Sulfato de Sódio
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico
EC-12	Paraprobiótico <i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
F4/80	Receptor acoplado à proteína G de adesão E1

FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
FL118	10,11-(Metilenodioxi)-20(S)-camptotecina
FOLFIRI	Regime de quimioterapia (Ácido Folínico, 5FU e Irinotecano)
FOLFOX	Regime de quimioterapia (Ácido Folínico, 5FU e Oxaliplatina)
FOXP3	Caixa da forquilha P3
FUBP1	Proteína de ligação 1 do elemento distante a montante (FUSE)
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GSH	Glutationa reduzida
GSK-2269557	Nemiralisib Hydrochloride;; 2-[6-(1H-Indol-4-yl)-1H-indazol-4-yl]-5-[(4-propan-2-ylpiperazin-1-yl)methyl]-1,3-oxazole hydrochloride
HE	Hematoxilina/Eosina
HER-2	Tirosina quinase 2 do receptor erb-b2
HPV	Papilomavírus humano
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
IFN- γ	Interferon gama
ICV-STZ	estreptozotocina intra-cerebroventricular
IL	Interleucinas
ILC2	Células linfóides inatas do grupo 2
Ile	Isoleucina
IPI-549	(S)-2-Amino-N-[1-[8-[2-(1-metilpirazol-4-il)etil]-1-oxo-2-fenilisoquinolin-3-il]etil]pirazolo[1,5 -a]pirimidina-3-carboxamida (inibidor de PI3K γ)
IRI	Irinotecano
ISOO	Sociedade Internacional de Oncologia Oral
JNK	C-Jun NH 2 -terminal cinase
KC	Quimiocina (motivo C-X-C) ligante 1
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LPS	Lipossacarídeo
LRP1	Proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
LY294002	Cloridrato de 2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-ona (inibidor de PI3K)
Lys	Lisina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MASCC	Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer
Mc-38	Linhagem celular de adenocarcinoma de cólon murino (C57BL/6)
MCP1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MD-2	Fator de diferenciação mielóide-2
MDA	Malondialdeído
MDM2	Supressor de tumor p54 (" <i>murine double minute 2</i> ")
miRNA	Micro RNA
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
<i>Mtor</i>	Gene do Alvo mecanístico da rapamicina quinase
MUC2	Mucina 2

MyD88	Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de sódio
NCL	Instituto Nacional do Câncer
NFkB	Fator nuclear kappa B
NP-SH	Grupo sulfidrílico não-proteico
NTC	[7-etil-10-(4-amino-1-piperidino)- carboniloxicamptotecina]
OATP	Polipeptídeo de Transporte de Ânion Orgânico
OMS	Organização Mundial da Saúde
p101	Complexo da subunidade reguladora da PI3K p101
p53	Proteína relacionada à transformação 53
p87	Complexo da subunidade reguladora da PI3K p87
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato salino
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase, isoenzima 1
PH	Domínio de homologia pleckstrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
<i>Pi3kcg</i>	Gene Fosfatidilinositol-3-cinase gama
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RAC	Subfamília da Rho <u>GTPases</u>
RAS	Oncoproteína (<i>RAt Sarcoma virus</i>)
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos
RNA	Ácido ribonucleico
RTK	Receptores de tirosina cinase
RTOG	Grupo de Oncologia de Radioterapia
SHIP	Inositol polifosfato-5-fosfatase D
SEM	Erro padrão da média
SN-38	7-Etil-10-hidroxicamptotecina
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
SRB	Sulforodamina B
ST2	Supressão da proteína tumorigenicidade 2
SUS	Sistema Único de Saúde
TBA2	Tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TCR	Receptor de célula T
TGFβ	Fator transformador de crescimento, beta 1
Th	T helper
Th2	T helper 2
TLR	Receptor do tipo toll
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TMP	Tetrametoxi-propano

TNBS	Ácido Trinitrobenzeno Sulfônico
Treg	T reguladoras
TWEEN-20	Tensoativo Hidrofílico Polisorbato 20
Tyr	Tirosina
UGT	Uridina difosfato glucoronisil transferase
VPS15	Proteína reguladora da PI3K subunidade 4
WT	Wild type (camundongos selvagens)

LISTA DE SÍMBOLO

%	Porcentagem
-/-	Nocaute
<	Menor
±	Mais ou menos
Δ	Delta
®	Marca registrada
μ	Micro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
hs	Horas
kg	Kilograma
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
rmp	Rotação por minuto
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ηg	Nanograma
ηM	Nanomolar
κ	Kappa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Mucosite: um efeito adverso habitual no tratamento oncológico	20
1.2 Irinotecano	25
1.2.1 Toxicidade do irinotecano e estratégias terapêuticas	30
1.2.2 Interações imunológicas envolvidas no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	31
1.3 Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) de classe I são alvos promissores em patologias	35
1.3.1 Inibidores seletivos para PI3K gamma.....	39
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo Geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 MATERIAS E MÉTODOS	45
4.1 Aspectos éticos	45
4.2 Animais	45
4.3 Células	45
4.4 Drogas	45
4.5 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano	45
4.5.1 Protocolo I: Definição da dose do irinotecano no modelo de mucosite.....	45
4.5.2 Protocolo II: Inibição da PI3K γ no modelo de mucosite induzida por irinotecano .	46
4.5.3 Protocolo III: Potencial antitumoral do inibidor de PI3K γ , AS-605240, associado ao irinotecano	46
4.5.4 Resumo do fluxo de trabalho	46
4.6 Avaliação ponderal	47
4.7 Contagem de leucócitos totais	47
4.8 Avaliação de parâmetros inflamatórios	48
4.8.1 Expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	48
4.8.2 Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	49
4.8.3 Atividade da malondialdeído (MDA).....	49
4.8.4 Ensaio da glutathiona reduzida (GSH)	50
4.8.5 Imunofluorescência	50
4.8.6 Dosagem de citocinas IL-1 β e IL-6	51

4.9	Avaliação dos parâmetros morfométricos	52
4.9.1	Avaliação da relação Vilo/cripta	52
4.9.2	Escores histopatológicos	52
4.10	Avaliação dos parâmetros funcionais	53
4.10.1	Coloração com Alcian Blue-PAS e histologia quantitativa das células caliciformes	53
4.10.2	Avaliação da diarreia	53
4.11	Peso tumoral	54
4.12	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	A via PI3K/AKT/mTOR participa da lesão intestinal no modelo de mucosite por irinotecano	55
5.2	A inibição de PI3Kγ altera a polarização de linfócitos no modelo de mucosite intestinal por irinotecano	59
5.3	Os escores de diarreia são atenuados ao inibir PI3Kγ	64
5.4	A proteção da lesão intestinal ao inibir PI3Kγ não compromete o efeito antineoplásico do irinotecano	64
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	76
8	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mucosite: um efeito adverso habitual no tratamento oncológico

Na terapia oncológica, seja por radioterapia, quimioterapia, terapias-alvo ou imunoterapia, podem ocorrer interações fora do alvo que são manifestados por efeitos adversos que comprometem o tratamento e a qualidade de vida dos pacientes. Nesses casos, os protocolos adotados para atenuar as toxicidades incluem pausas de radioterapia, redução/interrupção de doses e modificação na seleção de agentes antineoplásicos (Ervin et al., 2020; Sonis, 2004; Sougiannis et al., 2021).

O trato alimentar (abrange da boca ao ânus) é um dos tecidos mais afetados pela quimioterapia, cuja lesão pode se apresentar em diferentes graus em decorrência de ulceração oral, aumento de taxas de infecção e diarreia (Bowen et al., 2019). A prevalência da toxicidade no trato alimentar pode variar de acordo com o regime terapêutico empregado, manifestando-se em aproximadamente 20 a 40% dos pacientes com tratamento de tumores sólidos e em 60 a 80% dos pacientes submetidos a transplantes de células hematopoiéticas (BASILE *et al.*, 2019), além de afetar praticamente todos os pacientes que recebem radioterapia para câncer de cabeça e pescoço (KHAN; WARDILL; BOWEN, 2018). Estima-se que pacientes com quadro de mucosite tem o dobro de risco de adquirir infecção e três vezes mais tempo de internação. Além disso, a possibilidade de morte é quadruplicada nesses pacientes (Bowen et al., 2019). Esses dados discricionários podem ser agravados se considerarmos que, majoritariamente, os efeitos adversos são descritos como dados secundários em estudos clínicos e, no caso da mucosa intestinal, a dificuldade de acesso e à falta de testes confiáveis são fatores limitantes para a obtenção de dados reais acerca da incidência e gravidade desses índices.

Por definição, a mucosite é um dano sobre o revestimento mucoso do trato alimentar desenvolvido por um processo complexo que promove lesões inflamatórias e ulcerativas podendo se estender da boca ao ânus. Apesar da mucosite estar associada principalmente aos protocolos de tratamento oncológico, estes não são os únicos fatores envolvidos no agravamento desse efeito adverso. Outras características relacionadas ao paciente são parte determinante para essa toxicidade. Práticas como fumar, má higiene bucal, idade, pessoas do sexo feminino e terapia antineoplásica anterior contribuem para a mucosite mais grave (JONES *et al.*, 2006). Esse quadro é amplificado, ainda, em pacientes com doenças autoimunes (como deficiência de IgA),

diabéticos e imunossuprimidos estando associado ao aumento de internação e maior número de mortalidade nos 100 primeiros dias (Elting et al., 2003; Sonis et al., 2001).

Apesar do estudo da mucosite oral e intestinal ser muitas vezes realizadas separadamente, grupos de estudo direcionados à mucosite (MASCC/ISOO) tem considerado que esse efeito adverso ocorra do mesmo modo ao longo do trato alimentar com diferenças locais em termos de manifestação devido à função específica de cada região (ELAD *et al.*, 2020; KEEFE, 2004). Na mucosite oral, é observada dor, dificuldade de alimentação e deglutição, alterações no paladar e infecções secundárias. Já a mucosite gastrointestinal se apresenta por lesões no resto do trato alimentar com maior proeminência no intestino (SONIS *et al.*, 2004) e está associada a náuseas, vômitos, diarreia, distensão abdominal, cólicas intestinais e dor anal (ELAD *et al.*, 2020). Tais complicações além de comprometerem a qualidade de vida dos pacientes e o tratamento oncológico, também representam custos financeiros adicionais.

Historicamente, a mucosite foi pensada como resultado de uma lesão epitelial provocada pela inespecificidade do tratamento oncológico, afetando, também, as células de rápida proliferação promovendo a perda de capacidade de renovação do tecido da mucosa. A visão mais recente aponta para uma patogênese muito mais complexa e que envolve interações entre a função de barreira epitelial, o sistema imunológico da mucosa e a microbiota residente (KHAN; WARDILL; BOWEN, 2018). Tal condição seria decorrente de uma série dinâmica de eventos biológicos que podem ser integrados em um modelo onde as etapas se sobrepõem e estão inter-relacionadas por retroalimentação de amplificação de danos (LALLA *et al.*, 2019). Em resumo, são cinco as etapas que descrevem a evolução da mucosite (**Fig. 1**): iniciação (0–2 dias), regulação positiva/ativação (2–3 dias), amplificação do sinal (2–10 dias), ulceração com inflamação (variando entre 5–15 dias) e cicatrização (15–21 dias) (Sonis, 2004).

A fase de iniciação compreende a exposição à radiação ou quimioterapia provocando lesões nas células (endotélio, fibroblastos, macrófagos) induzindo dano ao DNA, estresse oxidativo e ativação da resposta imune inata à medida em que ocorre a liberação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs). Esses danos celulares desencadeiam eventos biológicos mediados pela ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), resultando em uma regulação positiva que envolve pelo menos 200 mensageiros de resposta inflamatórias. Dentre estes, destacam-se citocinas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL) 6 e 1 β , e enzimas, como a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2). Nessa etapa, o aumento da expressão de genes envolvidos no processo de migração leucocitária e

angiogênese também é percebido. O somatório de todos esses processos inflamatórios promove a segunda fase no processo de evolução do quadro de mucosite (BASILE *et al.*, 2019; SOUGIANNIS *et al.*, 2021).

Na fase de amplificação do sinal e resposta local ocorre ativação de receptores do tipo Toll (TLR), regulação positiva do NF- κ B por meio de múltiplas vias de sinalização, agravamento da resposta inflamatória pela produção de espécies reativas de oxigênio, ativação do inflamassoma e de citocinas, incluindo TNF- α , IL-6, IL-1, IL-18 e IL-33 (Ribeiro *et al.*, 2016; Sonis *et al.*, 2004). Nesse contexto, estudos relatam a participação do TNF- α e da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP1) na promoção do recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o local do dano. Além disso, o TNF- α é um importante sinalizador para a ativação de quinases como a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e c-Jun NH₂-terminal quinase (JNK), que sinalizam para a ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) 1 e 3 em células do epitélio e da lâmina própria, resultando em lesão tecidual (Lalla *et al.*, 2019; Sonis, 2004).

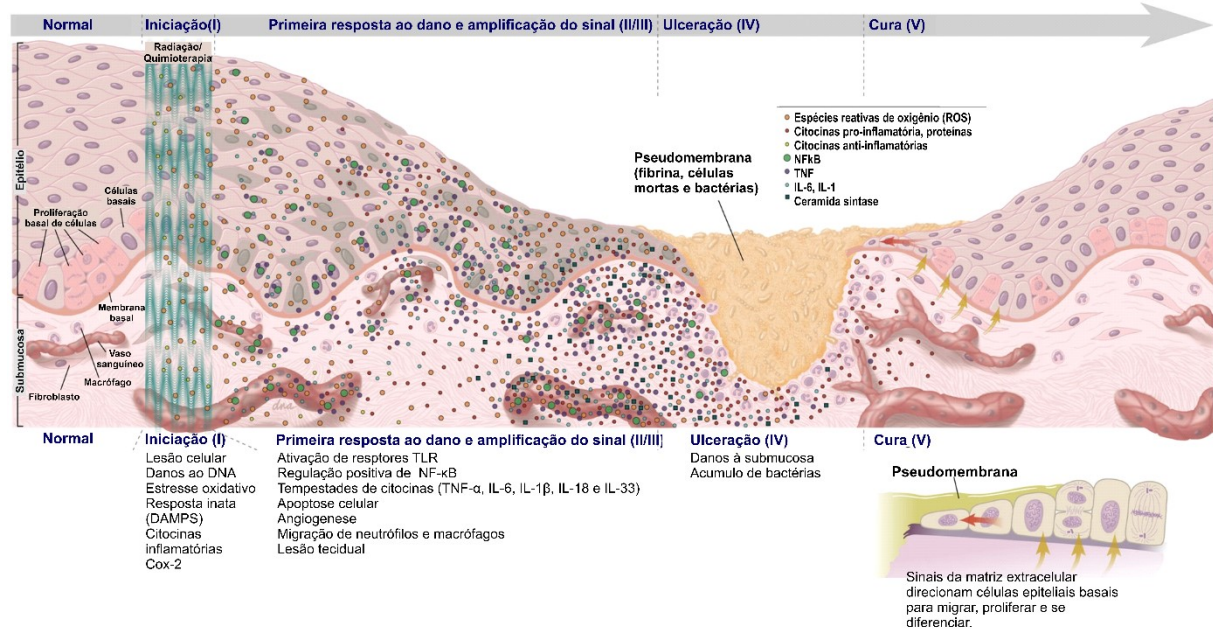
A próxima fase é caracterizada por ulcerações na camada epitelial, exacerbando a inflamação e provocando o avanço do dano para a camada submucosa. Estima-se que o lapso de tempo que envolve desde a lesão inicial até o dano manifesto clinicamente é de 4 dias para mucosite oral e cerca de 1 a 2 dias na mucosite intestinal após a administração da quimioterapia (BASILE *et al.*, 2019). Nesse período, ocorre colonização bacteriana nas úlceras, amplificando a resposta imune inata, quebra de junções epiteliais (LALLA *et al.*, 2019), limitando a capacidade de metabolizar nutrientes e xenobióticos (Bowen *et al.*, 2019).

Se considerarmos que muitos quimioterápicos apresentam efeito mielossupressor (SHITARA *et al.*, 2011), concomitantemente ao avanço da mucosite, os pacientes se tornam suscetíveis à bacteremia e sepse pela incapacidade do sistema imunológico de responder adequadamente ao dano tecidual, prolongando os distúrbios patogênicos (Sonis, 2004). Nessa fase, infecções como candidíase com incidência de 27 a 52% e Herpes simples 1 (em mais de 20%) são relatados, sobrepondo-se à mucosite em tratamentos com radioterapia (NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2021).

Finalmente, na última fase, ocorre a cicatrização das úlceras caracterizada pela proliferação, migração e diferenciação das células epiteliais em um mecanismo estimulado pela matriz extracelular e pela restauração simultânea da microbiota local que ocorre em aproximadamente 2 a 4 semanas em humanos (1 semana em roedores), como um processo auto

resolutivo durante a pausa da terapia oncológica (DAHLGREN *et al.*, 2021; LALLA *et al.*, 2019).

Figura 1: Patobiologia da mucosite oral/intestinal decorrente do tratamento oncológico.



Fonte: LALLA *et al.*, 2019 adaptado pela autora

A imagem descreve os cinco estágios de evolução da mucosite no tratamento à base de radioterapia e quimioterapia envolvendo a amplificação da resposta imunológica e danos à mucosa. (LALLA *et al.*, 2019 adaptado pela autora).

Como a maioria das doenças, a sintomatologia e manifestações clínicas da mucosite podem variar de forma branda com a mucosa intacta e relativa facilidade em ser controlada farmacologicamente, até casos com infecção grave e necessidade de hospitalização (Cancer Institute, 2017; Sonis *et al.*, 2004) Essas variações de intensidade comumente percebidas na prática clínica são classificadas de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), do Grupo de Oncologia de Radioterapia (RTOG) e dos Critérios Terminológicos Comuns para Eventos Adversos (CTCAE). Destes, o CTCAE é o mais universalmente aplicado para descrever os eventos adversos em ensaios oncológicos (VILLA *et al.*, 2021). A Tabela 1 descreve as escalas de graduação da CTCAE v5.0 e do NCI para a avaliação da mucosite associada à quimiorradioterapia e os escores de diarreia que é um dos principais sinais observados na clínica relacionados à mucosite intestinal.

Adicionalmente, é importante destacar que além da constante revisão dos escores avaliados pela CTCAE, há um campo de pesquisa que visa auxiliar na identificação dos

mecanismos de desenvolvimento da diarreia através de marcadores, possibilitando, assim, intervenções preventivas (ALEXANDER *et al.*, 2017).

Tabela 1: Comparação dos principais critérios usados para terminologia dos eventos adversos.

	GRAU I	GRAU II	GRAU III	GRAU IV	GRAU V
Mucosite Intestinal (diarreia)	Assintomática ou leve; intervenção não indicada	Sintomático; intervenção médica indicada; atividades de vida diária limitante*	Dor forte; alimentação por sonda, indicativo de hospitalização, atividades de vida diária de autocuidado**	Risco de vida; intervenção urgente	Morte
	NCI				
	Aumento de até 3 evacuações por dia	Aumento de 4 a 6 evacuações por dia	7 ou mais evacuações; incontinência; indicação de hospitalização	Risco de vida, intervenção urgente	Morte

Atividades de vida diária limitante*: referem-se ao preparo de refeições, fazer compras de mantimentos ou roupas, uso do telefone, administrar dinheiro

Atividades de vida diária de autocuidado**: referem-se a tomar banho, vestir-se e despir-se, alimentar-se, usar o banheiro, tomar medicamentos mesmo em não acamados.

Abreviaturas CTCAE: critérios terminológicos comuns para eventos adversos; NCI: Instituto Nacional do Câncer do Instituto Nacional de Saúde (NIH)

Fonte: Adaptado de VILLA *et al.*, 2021; CTCAE,2017 e RIBEIRO *et al.*, 2016

Se considerarmos exclusivamente a mucosite gastrointestinal induzida por quimioterapia, a gravidade e incidência observada na prática clínica depende do regime utilizado (RIBEIRO *et al.*, 2016). Dentre os antineoplásicos comumente associadas a esse efeito adversos estão os agentes alquilantes (busulfano, ciclofosfamida, cisplatina, melfalano), antimetabólitos (5-fluouracil, metotrexato), inibidor da topoisomerase I (irinotecano), entre outros. Esses antineoplásicos, além da utilização como agente único também são frequentemente administrados em combinação e, os índices de toxicidade são geralmente aumentados nesses casos (FERREIRA *et al.*, 2021).

Corroborando com o acima referido, a gravidade e incidência de mucosite em protocolos de agente único considerando escore 3-4 para irinotecano (diarreia tardia) e 5-Fluourouracil (5-FU) (*bolus*) são de 32% e 22%, respectivamente (STEIN; VOIGT; JORDAN, 2010). Adicionalmente, se considerarmos o estudo realizado com uma coorte de pacientes (n=114) que receberam quimioterapia para câncer colorretal, foi relatado diarreia moderada induzida por quimioterapia com escore igual ou superior a 2 em 89% dos pacientes que receberam FOLFIRI (Ácido Folínico, 5FU e irinotecano) e 56% dos que receberam FOLFOX (Ácido Folínico, 5FU e Oxaliplatina) (KEEFE *et al.*, 2014). Esses dados, apesar de

considerarem intensidades de escores distintos, exemplificam a incidência da mucosite intestinal em protocolos de combinação se comparados ao tratamento com agentes únicos.

Em ensaios clínicos de fase II e III propondo terapia adjuvante para câncer de cólon localizado descreveram diferentes índices de graus de diarreia 3/4 em combinações distintas de tratamento. No estudo MOSAIC usando FOLFOX vs 5-FU/Leucovorin (LV) apresentaram incidência de diarreia de 10,8% vs 6,6%; já no estudo NSABP C-07 com a combinação FLOX (5-FU + LV + Oxaliplatina) vs *bolus* 5-FU/ LV foi descrito 38% vs 32% e, no ensaio XELOXA com tratamento combinando XELOX (capecitabina, oxaliplatina) vs *bolus* 5-FU/LV os índices foram de 19% vs 20% (GELIBTER *et al.*, 2019). Ao considerarmos os índices de incidência e morte para esse tipo de câncer, tratamentos mais eficazes e menos tóxicos proporcionariam menor recorrência e aumento no tempo de sobrevivência nesses pacientes (GELIBTER *et al.*, 2019).

A contenção e prevenção desses índices são periodicamente analisadas em revisões sistemáticas com objetivo de atualizar as Diretrizes de Prática Clínica da Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer e da Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO) para o tratamento da mucosite. Além de descrever abordagens terapêuticas, são atualizados temas relacionados à patogênese, mecanismos, perspectivas e recomendações para a pesquisa. A última versão da revisão foi publicada em 2020 e traz atualizações na prática clínica com destaque para o uso de probióticos no tratamento de mucosite intestinal. Adicionalmente, pontua cenários clínicos para os quais não há intervenção recomendada, incluindo alívio da dor, suporte dietético e prevenção de infecções secundárias (ELAD *et al.*, 2020).

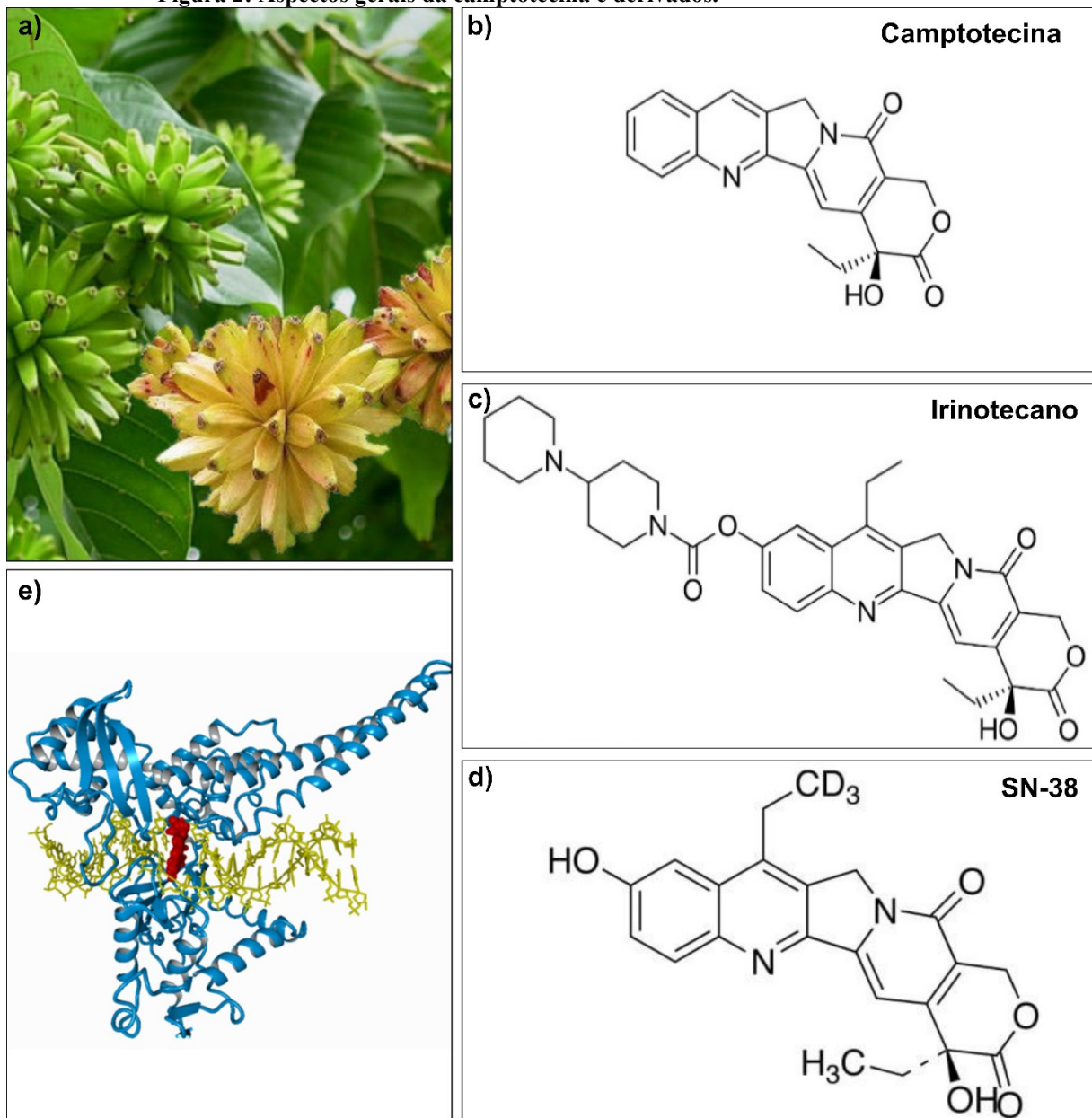
Nesse ponto, é válido destacar a contribuição do Laboratório de Farmacologia de Inflamação e do Câncer – LAFICA na investigação da mucosite intestinal induzida por antineoplásicos como o 5-Fluorouracil e o Irinotecano. Contudo, ainda há diversas abordagens a serem exploradas conforme discutiremos, em parte, aqui.

1.2 Irinotecano

O irinotecano, um pró-fármaco derivado de um análogo semissintético da camptotecina, é o primeiro antineoplásico inibidor da topoisomerase I aprovado para uso clínico (**Fig. 2**). Inicialmente, ele foi recomendado para o tratamento do câncer de cólon e, hoje, tem

aplicação ampla incluindo câncer de pulmão de não pequenas células, pâncreas, trato biliar, gástrico, cervical, entre outros. Com administração padrão na forma injetável para uso adulto e pediátrico (BAILLY, 2019; KCIUK; MARCINIAK; KONTEK, 2020).

Figura 2: Aspectos gerais da camptotecina e derivados.



Fonte: Google, KCIUK et al., 2020 adaptado pela autora

Isolado da *Camptotheca acuminata* (a), a camptotecina (b) é um alcaloide base para o análogo solúvel Irinotecano, que tem nome o químico cloridrato triidrato (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-piperidinopiperidino) carboniloxila]-1H-pirano [3',4',6,7] indolizino [1,2-b] quinolina-3,14(4H,12H)diona (c). Este, é um pró-fármaco que pode ser convertido em SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina) (d). Apesar de o irinotecano inibir a Topoisomerase 1 (e), estima-se que o SN-38 tem potencialidade pelo menos 100 vezes maior do que o Irinotecano. As imagens (b, c e d) são representações estruturais dos compostos derivados da *Camptotheca acuminata* (a). Enquanto, a imagem (e) representa o complexo ternário composto pela topoisomerase (azul), DNA (amarelo) e irinotecano/SN-38 (vermelho) (Fonte do complexo ternário: KCIUK, et al., 2020). Adaptado pela autora.

Os primeiros estudos com a camptotecina foram realizados em meados de 1984. Posteriormente, foi aprovado pelo Japão em 1994 o irinotecano. Nos anos seguintes, ocorreram diversos outros registros de uso, somando pelo menos 100 países em 2006. Hoje, é um antineoplásico largamente usado seja como primeira e/ou segunda linha de tratamento oncológico, além do uso na terapia adjuvante. Atualmente, o irinotecano é usado em monoterapia ou em combinações diversificadas com agentes citotóxicos, inibidores de quinase, inibidores de *check-point* imunológicos, além de conjugado com anticorpos (Bailly, 2019; Man et al., 2018). Além disso, a aprovação de análogos estruturais como o topotecano e a ampliação do painel de medicamentos na forma lipossomal Nal-IRI (Onivyde®, Ipsen) aprovado mundialmente em 2015 para câncer pancreático em associação com o 5FU e leucovorina (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2021; WOO; CAREY; CHOI, 2019) fazem desse fármaco um importante agente antineoplásico.

O sucesso na utilização do irinotecano e do seu metabólito ativo, SN-38, é tão patente que diversos estudos são continuamente encorajados. Recentemente, foi desenvolvida a formulação oral do fármaco (Oncoral®, Ascelia Pharma) e os primeiros resultados em estudo de pacientes com câncer de mama HER2 positivo foram animadores quanto à tolerância e atividade (KÜMLER *et al.*, 2019). Além disso, há o aprimoramento e desenho de outras formas de encapsulamento para diversas malignidades (BAILLY, 2019; MILANO; INNOCENTI; MINAMI, 2022), estudos farmacocinéticos de associação com diversos fármacos (DE MAN *et al.*, 2018) e o desenvolvimento de novos derivados da camptotecina com destaque para o composto FL118 (BAILLY, 2019; HOLTHOF *et al.*, 2020).

Conforme descrito anteriormente, o irinotecano tem ação anticâncer, principalmente, pela inativação da topoisomerase I. Essa enzima, pertence a uma classe de proteínas nucleares que promovem o alívio de tensões no DNA em processos de replicação e transcrição. Em resumo, o estresse topológico é revertido pela ligação da topoisomerase I em um sítio específico do DNA, seguido pela quebra transitória de uma das fitas permitindo que o DNA supertorcido relaxe em um mecanismo de “rotação controlada” com posterior religação da fita. O irinotecano inibe esse processo através da formação de complexo ternário (**Figura 2**), irinotecano/SN-38 - topoisomerase I - DNA cortado, evitando a religação da fita de DNA e impedindo a liberação da topoisomerase I. Nesse ponto, a forquilha de replicação colide com o complexo recém-formado, resultando em danos adicionais ao DNA com posterior parada da

replicação e morte celular (KCIUK; MARCINIAK; KONTEK, 2020; STENVANG *et al.*, 2013).

Além da inibição da topoisomerase I, estudos recentes têm descrito outros alvos celulares para o irinotecano, incluindo um novo mecanismo de ação pelo qual atua como inibidor duplo da proteína MDM2, um regulador negativo do supressor tumoral p53, e da proteína anti-apoptótica Bcl-xL por meio de ligação direta (LEE *et al.*, 2019). Outras interações também foram descritas, incluindo alterações na expressão de proteínas envolvidas no ciclo celular, em processos apoptóticos (MINDERMAN *et al.*, 2005), de TP53 (YUE *et al.*, 2021), além de comprometer a atividade do oncogene FUBP1 (Hosseini *et al.*, 2017).

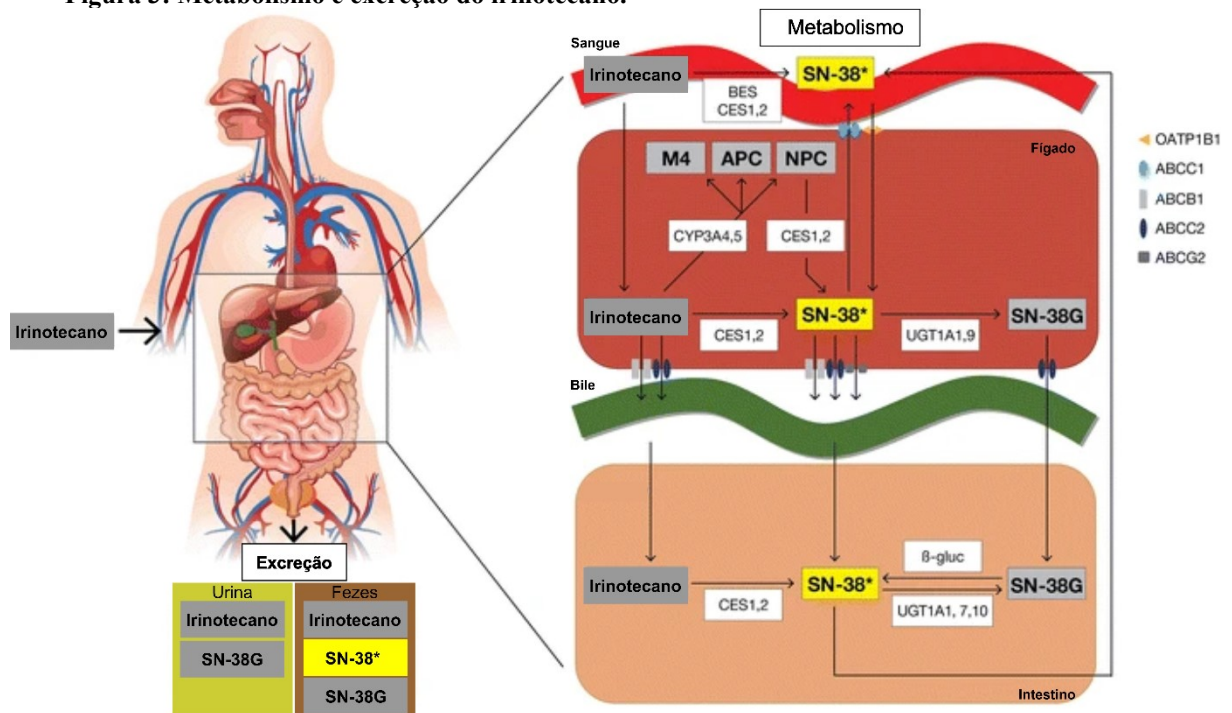
Apesar do amplo papel do irinotecano como antineoplásico, conforme descrito anteriormente, a inibição da topoisomerase I é o principal alvo nas células com rápida proliferação que, além das células tumorais, também envolve as células da medula óssea e intestinais, explicando muitas de suas toxicidades (KCIUK; MARCINIAK; KONTEK, 2020).

Outro mecanismo relacionado ao perfil de toxicidade do tratamento à base de irinotecano reside em seu processo metabólico. Entre as enzimas que participam dessa via, a Uridina difosfato glucoronil transferase (UGT1A1) e a β -Glucuronidase (β -gluc), de bactérias, estão diretamente associadas a perfis agravados de toxicidade. Diversos estudos descrevem o papel da UGT1A1 na diarreia (SUN *et al.*, 2020) e neutropenia (SHIRASU *et al.*, 2019), enquanto a β -gluc bacteriana está principalmente relacionada aos índices agravados de diarreia (CHAMSEDDINE *et al.*, 2019; YUE *et al.*, 2021). Um estudo complementar destaca, ainda, a participação dos transportadores ABC (ABCB1, ABCC1–ABCC6 e ABCG2) e os OATP (SLCO1B1) como alvos relevantes nesse processo de agravamento da toxicidade (PAULÍK; NEKVINDOVÁ; FILIP, 2020). Variabilidades interindividuais ocasionadas por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de diversas proteínas também têm sido descritas como relacionadas ao desenvolvimento de toxicidades (KCIUK; MARCINIAK; KONTEK, 2020).

Esquemáticamente, o metabolismo do irinotecano envolve três etapas. A primeira é a hidrólise do irinotecano em SN-38 pelas carboxilesterases (CES2 e CES1) e butirilcolinesterase (BES). Essa etapa pode ocorrer no sangue, fígado e intestino com cinética enzimática distinta entre essas esterases, enquanto as CES atuam principalmente no fígado a BES tem maior atividade no sangue. A segunda etapa consiste na inativação catalisada pela UGT para gerar o metabólito inativo SN-38 glucoronídeo (SN-38G) no fígado, com posterior excreção na bile e intestino. Além do SN-38, o irinotecano também é metabolizado por enzimas

hepáticas do citocromo P450 (CYP3A4 e CYP3A5) nos metabólitos inativos APC e NTC. Diferente do APC, o composto NTC pode ser convertido em SN-38 pelas CES1 e CES2, com maior participação da CES2 em todo o processo metabólico. Na terceira etapa, ocorre a reativação do SN-38G por β -glucuronidases de bactérias presentes no intestino restaurando localmente os níveis de SN-38 que podem ser reabsorvidos em um processo conhecido como circulação êntero-hepática. O irinotecano e seus metabólitos são transportados, principalmente, pelas proteínas OATP que participam do influxo do sangue para os hepatócitos, e os transportadores ABC que promovem o efluxo para a bile e urina. A eliminação do irinotecano é principalmente biliar, representando cerca de 66%. Contudo, também podem ser excretados pelas fezes e urina conforme detalha a **Figura 3** (BAILLY, 2019; DE MAN *et al.*, 2018; TAO *et al.*, 2020).

Figura 3: Metabolismo e excreção do irinotecano.



Fonte: MAN *et al.*, 2018

A via metabólica do irinotecano pode ser dividida em três etapas principais: **1)** conversão do irinotecano em SN-38* (7-etil-10-hidroxicamptotecina (ativo)) pelas carboxilesterases (CES2 e CES1) e butirilcolinesterase (BES); **2)** desintoxicação do SN-38 em SN-38G (SN-38 glucoronídeo (inativo) catalisada pela UGT (Uridina difosfato glucoronisil transferase) e, **3)** reativação do SN-38 a partir do SN-38G pelas β -glucuronidases (β -gluc). Tanto o irinotecano como o SN-38 podem ser metabolizados em M4, APC, NPC (metabólitos inativos) pelas enzimas do hepáticas do citocromo P450 (CYP3A4 e CYP3A5). Além das proteínas enzimáticas, são descritas na literatura proteínas hepáticas de membrana (ABCB1, ABCC2, ABCG2, OATP1B1, ABCC1) que atuam no transporte do irinotecano, SN-38* e SN-38G da corrente sanguínea para o fígado e deste para a bile. A depuração do irinotecano e dos metabólitos formados podem ser excretados pela urina e fezes.

1.2.1 Toxicidade do irinotecano e estratégias terapêuticas

O esquema de tratamento, a inespecificidade sobre as células de alta proliferação, as variações interindividuais das enzimas envolvidas no metabolismo e a disbiose intestinal com consequente aumento da β -glucoronidase são fatores críticos que promovem índices agravados de toxicidade no tratamento à base de irinotecano, com maior frequência para os casos de neutropenia e diarreia que elevam o risco de morte dos pacientes. Outras toxicidades relatadas, em casos raros, incluem lesão hepática, disartria e retinopatia (CHAMSEDDINE *et al.*, 2019).

Dentre essas toxicidades, a diarreia requer especial atenção por seu impacto no direcionamento do tratamento. Dois tipos de diarreia são percebidos durante o uso do irinotecano: a diarreia precoce e a diarreia de início tardio. A diarreia precoce tem início durante ou imediatamente após a infusão do quimioterápico e é provocada por uma síndrome colinérgica aguda que aumenta a contratilidade intestinal e reduz sua capacidade absorptiva, além de poder vir acompanhado de sudorese, cólicas abdominais, miose e salivação. Apesar de não apresentar risco de vida, a sintomatologia compromete a qualidade de vida dos pacientes. Devido sua incidência ocorrer em torno de 70%, é habitual a administração prévia de atropina, antagonista colinérgico (Man *et al.*, 2018).

Já a diarreia de início tardio, que ocorre em média de 8 a 10 dias após a infusão do irinotecano, é caracterizada por episódios diarreicos frequentes ao longo do dia que promovem o desequilíbrio eletrolítico aumentando o risco de morte dos pacientes. Atualmente, o tratamento é feito extensivamente com loperamida (agonista opioide), octreotida (BAILLY, 2019) e probióticos (ELAD *et al.*, 2020). No entanto, essas intervenções podem ser insuficientes por serem sintomáticos, mantendo, em alguns casos, a necessidade de intervenção hospitalar por não mudarem o curso da lesão inflamatória intestinal subjacente (Man *et al.*, 2018).

Diversas outras estratégias para mitigar as toxicidades gastrointestinais do irinotecano foram avaliadas em fases distintas de pesquisa, como a identificação de SNPs como preditores de suscetibilidade de toxicidade ou de resposta ao tratamento, intervenções farmacológicas visando o metabolismo e depuração como a ciclosporina (inibe os transportadores ABC) e fenobarbital (indutor de UDG1A1), além de terapias com antibióticos e carvão ativado (Man *et al.*, 2018).

A causa da diarreia tardia se deve, em parte, ao dano à mucosa intestinal seguido pelo aumento do infiltrado inflamatório. Contudo, os tratamentos farmacológicos voltados à

modulação do sistema imunológico têm gerado resultados limitados. Há descrição na literatura de reguladores da microbiota, impactando de forma indireta sobre as células imunes, com antibióticos e probióticos (YUE *et al.*, 2021). Além disso, o uso do antiinflamatório celecoxib, inibidor de COX2 em estudo de fase I, que apesar de bem tolerado, se mostrou inconclusivo (Argiris *et al.*, 2006; Man *et al.*, 2018).

1.2.2 Interações imunológicas envolvidas no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano

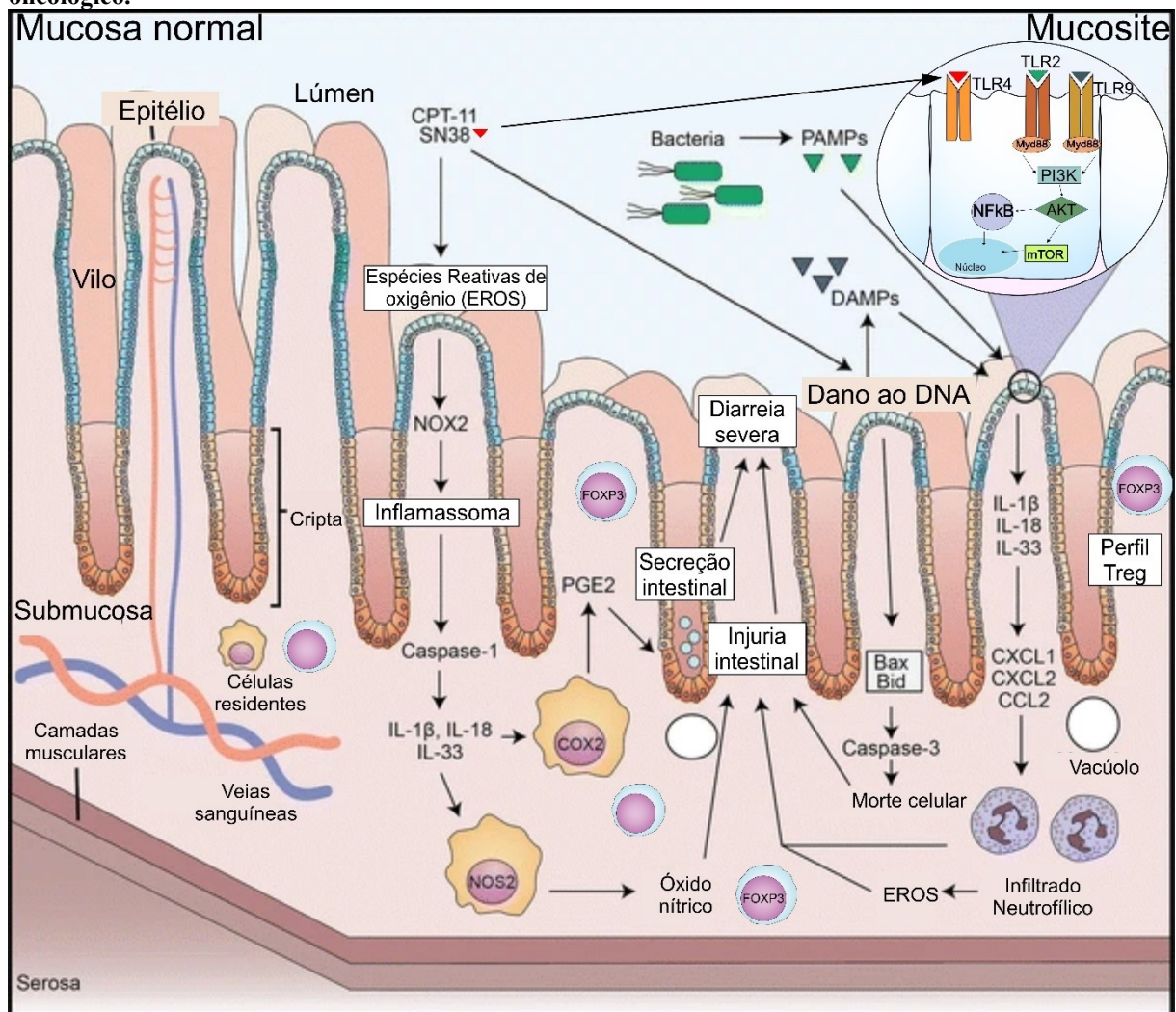
A complexidade e particularidades das interações imunológicas envolvidas na mucosite à base irinotecano são fatores limitantes para a implementação de novos fármacos que visem a contenção da resposta inflamatória. Nos últimos anos, o LAFICA tem se dedicado ao aprimoramento e desenvolvimento de estratégias que permitam reproduzir em modelo murino aspectos relevantes observados na clínica, além de investigar possíveis alvos que modulam a resposta imunológica, como intervenções à base de probióticos e compostos proteicos de extratos vegetais. A **Figura 4** resume algumas das contribuições do LAFICA no entendimento dos mecanismos patogênicos envolvidos no agravamento da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano.

O modelo de mucosite foi inicialmente adaptado por Melo e colaboradores (2008). Nele foi estabelecida a dose de 75 mg/kg por quatro dias consecutivos com posterior eutanásia no quinto ou sétimo dia. Nesse período de tempo foram observados parâmetros relacionados à mucosite como: perda de peso, leucopenia, alterações histopatológicas e inflamatórias. Um dado relevante no desenvolvimento dessa metodologia foi a observação de diarreia com menor índice de mortalidade se comparado com a dose estabelecida anteriormente de 100 mg/kg. Somado isso, foi feita a substituição da administração de dose única do irinotecano por doses repetidas a fim de mimetizarem os ciclos quimioterápicos na clínica. Adicionalmente, foi constatado a participação do TNF- α , IL-1 β e KC, análogo do IL-8 humano, na patogênese da mucosite e, ao tratar os animais com pentoxifilina e talidomida foram observados uma redução de danos histopatológicos e de parâmetros inflamatórios. Contudo, apenas a pentoxifilina reduziu parâmetros diarreicos (MELO *et al.*, 2008).

Outro modelo desenvolvido pelo LAFICA com o intuito de reproduzir o tratamento quimioterápico comumente realizado na clínica, consistiu na combinação de irinotecano e 5FU em diferentes doses por via intraperitoneal durante quatro dias com posterior eutanásia no

sétimo dia. Foi estabelecido que o irinotecano (45 mg/kg) combinado com 5-FU (37,5 mg/kg) induz diarreia significativa, reduz o peso corporal, causa dano intestinal, infiltrado inflamatório, e baixa mortalidade (Pereira et al., 2016).

Figura 4: Modelo hipotético da mucosite intestinal induzida por irinotecano durante o tratamento oncológico.



Fonte: RIBEIRO et al., 2016 adaptado pela autora

A mucosite intestinal envolve a participação do óxido nítrico, caspase 1, NFκB e das citocinas IL-18, IL-33, IL-1β na amplificação da resposta inflamatória. Esse agravamento, é parcialmente compensado por uma resposta celular do tipo Treg. Adicionalmente, além da participação direta do SN-38 na morte celular, provocada por danos ao DNA e espécies reativas de oxigênio, foi verificado um antagonismo competitivo do SN-38 com a proteína MD-2 que forma um complexo com os receptores TLR4 com consequente amplificação da resposta imunológica via TLR2, TLR9 e participação da proteína adaptadora MyD88.

A partir desses modelos, foram descritos diversos alvos da resposta inflamatória. Nesse processo, demonstrou-se a participação do óxido nítrico pela inibição com aminoguanidina ou iNOS^{-/-} (Lima-Júnior et al., 2012); da citocina IL-18, via inibição com IL-18bp, caspase1^{-/-} ou IL-18^{-/-}, (Lima-Júnior et al., 2014); e da citocina IL-33, bloqueada com anticorpo anti-IL-33 ou ST2^{-/-}(receptor solúvel de IL-33) (GUABIRABA *et al.*, 2014). Em todos os contextos, houve redução do dano histopatológico, da atividade da mieeloperoxidase, da expressão de citocinas pró-inflamatórias, da diarreia e aumento da sobrevivência dos animais.

A resposta inflamatória promovida pelo irinotecano envolvendo mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-18 e IL-33 (RIBEIRO *et al.*, 2016) levou à investigação da participação das células do sistema imunológico adaptativo. Marcadores referentes a Treg e Th17 foram avaliados por citometria de fluxo nos dias 5 e 7 após a primeira injeção de irinotecano. Foi observado o aumento na presença dessas células ao longo do tempo bem como o agravamento do dano intestinal. Além disso, foi verificado que a depleção das células Treg com ciclofosfamida levou ao agravamento da mucosite com aumento na frequência de outros subconjuntos de células T auxiliares, indicando o papel crítico das Tregs no controle da mucosite por irinotecano (FERNANDES *et al.*, 2018).

Durante o processo de amplificação da resposta inflamatória na mucosite, ocorre a ativação de receptores de reconhecimento de padrão relacionadas a danos (DAMPs) e patógenos (PAMPs). Nesse sentido, Wong e colaboradores (2015) avaliaram a participação dos receptores do Tipo Toll e da proteína Myd88 (proteína adaptadora de diferenciação mieloide), esta última com papel até então não descrita na mucosite intestinal. Inicialmente, foi verificado que animais nocaute de MyD88, TLR2 e TLR9 apresentam reduzida lesão intestinal associada ao irinotecano (Wong et al., 2015).

A investigação sobre o papel dos receptores TLR foi aprofundado em estudos posteriores utilizando SN-38 e Topotecano. Ensaios *in vitro* com células do tipo RAW 264.7 estimuladas com LPS (agonista de TLR4) apresentaram redução na resposta inflamatória quando da associação com SN-38. Adicionalmente, foi verificado o reestabelecimento da resposta inflamatória do LPS em concentrações aumentadas deste, sugerindo um antagonismo competitivo do SN-38 sobre o receptor TLR4. Resultados semelhantes foram observados *in vivo* em modelo inflamatório de bolsa de ar em camundongos onde a associação de SN38 e LPS reduziu a migração dos neutrófilos mediada pelo LPS (Wong et al., 2019).

A interação de TLR4 com SN-38 foi, ainda, corroborada em ensaio *in silico* por *docking* molecular em duas etapas, onde constatou-se que o SN-38 e o Topotecano ocupam a cavidade hidrofóbica de MD-2, molécula que forma complexo com TLR4, competindo, assim, pelo mesmo sítio de ligação do LPS (Wong et al., 2019).

Em estudo observacional e prospectivo com pacientes diagnosticados com câncer colorretal e tratados com irinotecano, verificou-se que polimorfismos para TLR4 que os tornam hiporresponsivos ao LPS aumentam a propensão à diarreia de início tardio. A validação desses achados ocorreu em camundongos TLR4^{-/-}, os quais igualmente apresentaram agravo da translocação bacteriana a partir do intestino, lesão intestinal, da inflamação e da diarreia (Wong et al., 2021). Tal agravo foi associado a uma exacerbação da resposta tardia mediada pelo TLR9 consequente à inação de TLR4 no curso inicial da doença. Portanto, a identificação previa desses polimorfismos, na clínica, podem ser usados na tomada de decisão quanto ao tratamento à base de irinotecano.

Outros trabalhos publicados pelo nosso grupo trazem uma redução de parâmetros inflamatórios a partir do tratamento com o paraprobiótico *Enterococcus fecalis* (EC-12) (NOBRE et al., 2022) e de proteína purificada proveniente de *Calotropis procera* (RANGEL et al., 2022), *Morinda citrifolia* L. (Carmo et al., 2022) e *Moringa oleífera* L. (dados não publicados) em animais submetidos ao modelo de mucosite à base de irinotecano.

Dada a participação dos TLR na mucosite e sua reconhecida associação com a atividade da PI3K/MyD88 promovendo a expressão das citocinas IL-1 β e TNF- α (Lima-Júnior et al., 2012; Ribeiro et al., 2016; Wong et al., 2015), foi analisado o papel dos intermediários da via TLR/PI3K/mTOR no modelo de mucosite por irinotecano. Os animais que receberam Everolimos e GSK-2269557 inibindo, assim, mTOR e PI3K δ , respectivamente, apresentaram uma potencialização da perda de peso e danos à mucosa, além de aumentarem parâmetros inflamatórios no intestino, como atividade da mieloperoxidase. Adicionalmente, o tratamento com Everolimos potencializou a expressão das citocinas INF γ e TGF β , enquanto o GSK-2269557 amplificou a migração de macrófagos e a fosforilação de AKT (dados não publicados). Apesar desses resultados inicialmente desanimadores quanto a possíveis alvos no controle da inflamação, é válido ponderar a diversidade de isoformas para a PI3K e, apesar da inibição da isoforma PI3K δ não reduzir parâmetros inflamatórios, há outra isoforma comumente associada a resposta inflamatória, PI3K γ , que será objeto de estudo na presente pesquisa.

1.3 Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) de classe I são alvos promissores em patologias

Fosfatidilinositol-3-Quinase (PI3Ks) é uma família de quinases lipídicas e proteicas altamente conservada que catalisa a fosforilação do fosfolípido fosfatidilinositol na posição 3 do anel Inositol. Esse processo contribui para a formação de segundos mensageiros que participam de diversas funções biológicas envolvidas no crescimento celular, metabolismo, diferenciação, sobrevivência, proliferação e migração celulares (HIRSCH *et al.*, 2008), sinalização e tráfego intracelular (BILANGES; POSOR; VANHAESEBROECK, 2019).

São descritos oito isoformas de PI3K em mamíferos, as quais se dividem em três classes: Classe I (PI3K $\alpha,\beta,\delta,\gamma$), Classe II (PI3KC2 α,β,γ) e Classe III (hVPS34) (**Tabela 2**) (FRUMAN *et al.*, 2017; HAWKINS; STEPHENS, 2015). Essa divisão baseia-se, principalmente, na estrutura molecular, na especificidade aos substratos lipídicos e nas suas características funcionais que estão diretamente relacionadas à sua distribuição nos tecidos (DURRANT; HERS, 2020; STARK *et al.*, 2015).

Das classes descritas para a PI3K, a classe I é subdividida em: classe IA (com subunidades catalíticas p110 α,β,δ) e classe IB (subunidade catalítica p110 γ). Essas enzimas de PI3K são formadas por um complexo heterodimérico a partir da junção das subunidades reguladoras e subunidade catalítica (p110), que caracteriza a isoforma. Outro ponto relevante, remete à característica de autoinibição da subunidade catalítica que permite seu estado inativo em repouso (JALIL *et al.*, 2023; RATHINASWAMY; BURKE, 2020).

Uma das principais características da subdivisão das enzimas de classe I é baseada na proteína regulatória e na sinalização à jusante aos receptores de tirosina quinase (RTKs) e de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que ativam PI3K de classe I e II, respectivamente. Contudo, alguns estudos já descrevem que essa divisão não é tão clara, com relatos da subunidade p110 β sendo ativada por GPCRs e a p110 γ funcionando à jusante a RTK, TLR e receptores de citocinas do tipo I (STARK *et al.*, 2015).

Tabela 2: Principais características das isoformas de PI3K.

ISOFORMAS	DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS	SUBSTRATO	PRODUTOS	SUBUNIDADE REGULADORA
CLASSE IA		PI(4,5)P ₂	PI(3,4,5)P ₃ ou PIP ₃	
	p110 α	Onipresente		p85/50/55 α ; p85 β ; p55 γ
	p110 β	Onipresente		P85/50/55 α ; P85 β ; p55 γ

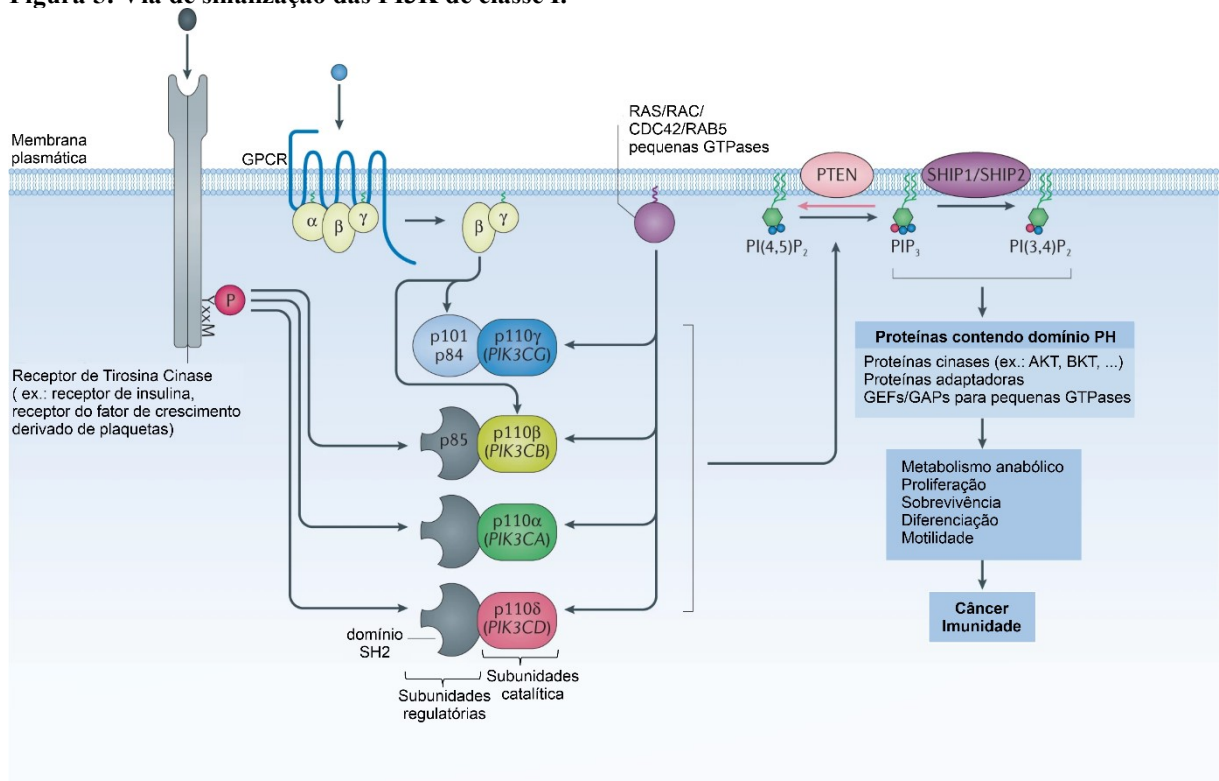
	p110 δ	Leucócitos, neurônios		P85/50/55 α ; P85 β ; p55 γ
CLASSE IB			PI(4,5)P ₂	PI(3,4,5)P ₃ ou PIP ₃
	p110 γ	Leucócitos, miócitos cardíacos		P84; p101
CLASSE II			PI, PI4P	PI3P, PI(3,4)P ₂
	C2 α	Epitélio, endotélio		
	C2 β	Onipresente		
	C2 γ	Hepatócitos		
CLASSE III			PI	PI3P
	VPS34	Onipresente		VPS15(p150)

Fonte:(STARK *et al.*, 2015)

Em síntese, a via de sinalização das isoformas da classe I são regulados direta ou indiretamente por receptores de superfície celular, como receptores de tirosina quinase (RTKs), receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e GTPases como RAS, RAC e CDC42 a partir de diversos tipos de sinais, sejam eles coestimuladores, citocinas, fatores de crescimento, integrinas, insulina, TCR, entre outros. Ao ser ativada, a PI3K fosforila seletivamente o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P₂ ou PIP₂) e forma o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI(3,4,5)P₃ ou PIP₃). Este pode ser desfosforilado na posição 3 pela enzima PTEN e retornar ao estado de substrato da PI3K ou pode ser desfosforilado pelas fosfatase da família SHIP (1/2) na posição 5 e formar fosfatidilinositol 3,4-bifosfato (PI(3,4)P₂). Ambos os produtos lipídicos, PIP₃ e PI(3,4)P₂, atuam como segundos mensageiros que recrutam numerosas proteínas efetoras, sendo amplamente descritas as que contem domínio de homologia pleckstrina (PH), como a AKT, o complexo mTOR2, quinase dependente de fosfoinosítídeos (PDK1), entre outras (HAWKINS; STEPHENS, 2015; O'DONNELL *et al.*, 2018; POMPURO; DOMINGUEZ-VILLAR, 2018; VANHAESEBROECK *et al.*, 2021).

A amplificação da sinalização via PI3K atua em diversas funções e alterações no seu padrão de expressão podem contribuir para patologias no contexto oncológico e inflamatório (HIRSCH *et al.*, 2008; JALIL *et al.*, 2023) (**Figura 5**). Uma das condições observadas com frequência refere-se à inativação do PTEN no contexto oncológico pela perda de expressão ou mutação do gene que a codifica, aumentando, assim, os níveis de PIP₃ e contribuindo para o crescimento tumoral (VANHAESEBROECK *et al.*, 2021). Em referência à PI3K, diversas condições de amplificação ou silenciamento de expressão são citadas, como mutações de p110 α em tumores malignos, a p110 δ em imunodeficiência primárias, p110 β no câncer de próstata e p110 γ em contextos inflamatórios, no ambiente imunológico tumoral e em doenças cardiovasculares (RATHINASWAMY; BURKE, 2020).

Figura 5: Via de sinalização das PI3K de classe I.



Fonte: VANHAESEBROECK et al., 2021 adaptado pela autora

A classe I da PI3K é composta por quatro isoformas que catalisam a fosforilação do PIP₂ em PIP₃ a partir de diversos sinais à montante dos receptores tirosina quinase (RTKs), receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e GTPases como RAS, RAC e CDC42. A formação desses segundos mensageiros, PIP₃ e PI(3,4)P₂, ativa proteínas com domínio de homologia pleckstrina (PH) que participam de diversos processos fisiológicos e pode ser alvo de diversas condições patológicas, incluindo o câncer e desordens inflamatórias.

Para melhor compreender as interações de um alvo do ponto de vista experimental, pode-se realizar o silenciamento genético a fim de caracterizar suas funções biológicas. Nesse contexto, foi verificado em camundongos heterozigóticos que as enzimas PI3K α e PI3K β tem papel crucial no desenvolvimento embrionário. Entretanto, para as isoformas PI3K δ e PI3K γ o silenciamento total não compromete a viabilidade desses animais, os quais apresentam vida útil aparentemente normal, com descrição de fenótipos alterados na resposta inata e adaptativa

diante de situações de estresse imunológico. Isso se deve à expressão no sistema hematopoiético desempenhando funções não redundantes em mastócitos, neutrófilos, células dendríticas, células B e T, fazendo dessas isoformas alvos chave em contextos inflamatórios e autoimunes. (HAWKINS; STEPHENS, 2015; ROMMEL; CAMPS; JI, 2007). Além disso, ferramentas farmacológicas como os pan-inibidores de PI3K, Wortmannin e LY294002, tem sido usadas por mais de uma década em estudos *ex vivo* a fim de compreender melhor as vias de sinalização reguladas pelas PI3K (ROMMEL; CAMPS; JI, 2007).

A participação da PI3K no contexto no câncer e na desregulação imunológica estimulou o desenvolvimento de inibidores terapêuticos e, vários deles já receberam aprovação de uso seja como inibidores seletivos como o idelalisibe (Zydelig/CAL-101/GS-1101; Gilead Sciences) que foi o primeiro aprovado, em 2014, com seletividade para a PI3K δ ou pan-inibidores de classe I como o copanlisibe (Aliqopa/BAY 80-6946; Bayer) aprovado em 2017. Adicionalmente, inibidores com seletividade dual para PI3K δ /PI3K γ como o duvelalizibe (Copiktra/IPI-145/INK1197; Verastem/SecuraBio) teve uso clínico aprovado desde 2018, enquanto o alpelisibe (BYL-719), específico para PI3K α , foi lançado no mercado em 2019. Estes inibidores exemplificam a importância clínica dessas isoformas, além da crescente ênfase em desenvolver inibidores cada vez mais específicos (VANHAESEBROECK *et al.*, 2021; ZHU *et al.*, 2021).

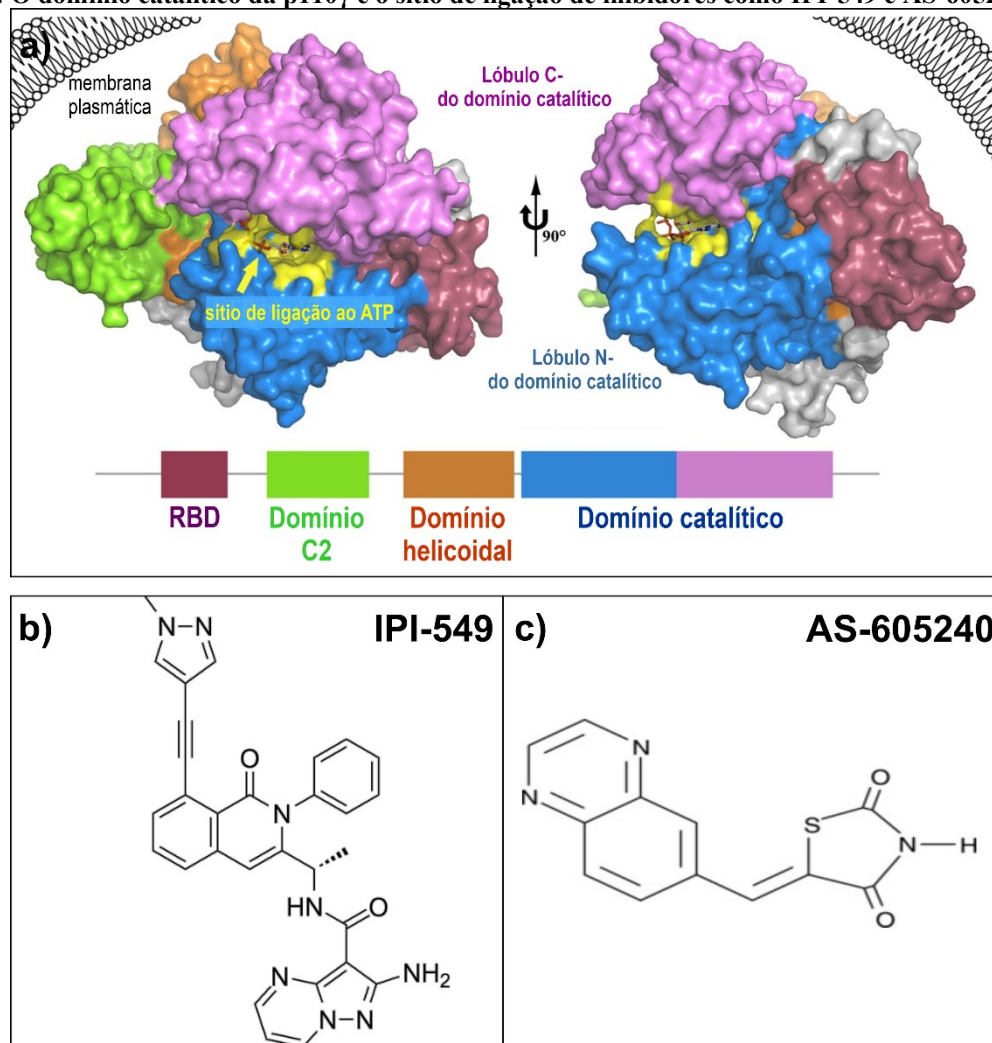
Apesar do progresso evidente, o desenvolvimento de inibidores tem passado por desafios decorrentes da tolerabilidade às toxicidades do tratamento e resistência que subvertem o efeito inibitório. Por exemplo, o uso de pan-inibidores está associado a toxicidades como diarreia. Mesmo nos inibidores seletivos é improvável que os compostos inibam apenas uma isoforma no contexto clínico e, nesses casos, o objetivo é desenvolver inibidores que tenham maior seletividade como o umbralisibe, um inibidor de segunda geração que ampliou a seletividade para as isoformas PI3K α , PI3K β comparado à PI3K γ (VANHAESEBROECK *et al.*, 2021).

Se considerarmos exclusivamente o envolvimento da PI3K na resposta imunológica, têm sido descrita a participação das isoformas p110 γ , p110 δ e, posteriormente, p110 β (HAWKINS; STEPHENS, 2015). Destas isoformas, a p110 γ é expressa quase que exclusivamente pelo sistema hematopoiético, especificamente nos leucócitos (RÜCKLE; SCHWARZ; ROMMEL, 2006) e tem sido alvo de análise em diversos contextos como artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (ZHU *et al.*, 2021).

1.3.1 Inibidores seletivos para PI3K gamma

Especificamente, a isoforma PI3K γ é composta por um heterodímero formado pela subunidade reguladora p101 ou p84/p87 associada à subunidade catalítica p110 γ . Esta última teve sua estrutura estabelecida por cristalografia no ano de 1999 e há descrição de quatro domínios: um domínio de ligação à RAS (RBD), um domínio C2, um domínio helicoidal e um domínio catalítico ou domínio quinase. Destes, o domínio catalítico contém lóbulos N e C-terminais ligados por uma alça formando um bolso de ligação ao ATP (**Figura 6A**) com estrutura conservada entre as isoformas. Nesse caso, representa um fator desafiador na projeção de inibidores seletivos. Essa estrutura de bolsa de ATP é dividida, ainda, em quatro regiões baseadas na interação com os inibidores, são elas: região de dobradiça, bolsa de especificidade, bolsa de afinidade e região hidrofóbica II (ZHU *et al.*, 2021).

Figura 6: O domínio catalítico da p110 γ é o sítio de ligação de inibidores como IPI-549 e AS-605240.



Fonte: Google, ZHU et al.,2020 adaptado pela autora

A estrutura organizacional da p110 γ envolve quatro domínios, destes o lóbulo N e C do domínio catalítico formam um sítio de ligação ao ATP (**a**) que interage com os inibidores de PI3K como o IPI549 (**b**) aprovado para estudo clínico de fase II e o AS-605240 (**c**) que faz parte da segunda geração de inibidores AS que amplificou a potência de seletividade para a isoforma γ em 100 vezes.

Outro aspecto considerado limitante na obtenção de inibidores seletivos de PI3K γ refere-se ao bloqueio da atividade enzimática sem discriminar as variantes de PI3K γ que compartilham a p110 γ por meio das subunidades regulatórias p101 e p87. Portanto, supõe-se que uma compreensão mais precisa dos processos não enzimáticos que envolvem essas subunidades e a elaboração de inibidores que atuem considerando essa interação permitiria maior especificidade entre as variantes da classe IB da PI3K γ (NÜRNBERG; BEER-HAMMER, 2019).

Apesar das dificuldades em estabelecer esses inibidores com maior seletividade devido às similaridades estruturais das isoformas de PI3K, novos inibidores são continuamente desenvolvidos por químicos medicinais. Até o momento para a PI3K γ , o inibidor IPI-549 (**Figura 6B**) oralmente ativo e seletivo para PI3K γ com IC₅₀ de 0,29 nM, expressamente menor que 17 nM para PI3K α , 82 nM para PI3K β , 23 nM para PI3K δ , desenvolvido pela Infinity Pharmaceuticals, está sob investigação clínica. Resumidamente, os primeiros estudos clínicos ocorreram em 2015 para avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica em monoterapia e em combinação com nivolumab em tumores sólidos avançados, câncer de pulmão de não pequenas células, melanoma e câncer escamoso de cabeça e pescoço. Já em 2019 foram realizados três ensaios clínicos de fase II direcionadas a patologias associadas ao HPV, câncer de mama triplo negativo, carcinoma de células renais e eficácia e segurança em combinação com nivolumab em pacientes com carcinoma urotelial avançado, destacando o amplo potencial terapêutico dessa inibição (ZHU *et al.*, 2021).

Além do IPI-549, outros inibidores têm seu potencial terapêutico continuamente descrito na pesquisa básica. Nesse ponto, a série de inibidores AS apresentou seletividade substancial à isoforma PI3K γ em detrimento das demais isoformas. O AS-604850 foi o primeiro grupo de inibidores seletivos descrito e a partir da sua estrutura cristalográfica foi desenvolvido o AS-605240 (**Figura 6C**) que demonstrou potencial inibidor melhorado com potência elevada em até 100 vezes, demonstrando maior permeabilidade celular em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Essa melhor interação dos inibidores AS foi descrita devido a fortes interações com os aminoácidos Lys833, Tyr867, Ile963 e Asp964,14,53,60 presentes no bolso de afinidade de PI3K γ que, apesar de ser conservado, apresentou flexibilidade conformacional distinta para essa isoforma

(CAMPS *et al.*, 2005a; POMEL *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2021). Essas moléculas, AS-604850 e AS-605240, apresentaram entre 7,5 e 30 vezes maior potência de seletividade em estudos *in vitro* comparado as demais isoformas. Mais especificamente, o AS-605240 tem IC50 de 8 nM para PI3K γ , 60 nM para PI3K α , 2700 nM para PI3K β , 300 nM para PI3K δ (YUAN *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a participação do AS-605240 no bloqueio da resposta inflamatória tem sido descrita em diversos contextos inflamatórios e autoimunes, incluindo artrite reumatoide (CAMPS *et al.*, 2005a; GRUEN *et al.*, 2010), pleurisia induzido por CpG (LIMA *et al.*, 2019), fibrose pulmonar (WEI *et al.*, 2010), lesão e fibrose renal induzido por angiotensina II (YU *et al.*, 2018), lúpus (SMITH *et al.*, 2007), colite (PENG *et al.*, 2010; SHARBA *et al.*, 2019a), entre outros. Além disso, o AS-605240 mostrou efeito protetor na cardiotoxicidade por antraciclina, além de reduzir o crescimento tumoral (LI *et al.*, 2018). Tais estudos nos direcionam a hipótese da participação da PI3K γ em outros contextos que envolvem eventos adversos provocados por processos inflamatórios decorrentes do tratamento oncológico.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das principais causas de morte nas Américas atingindo cerca de 4 milhões de casos em 2020. Somado a isso, há uma projeção de 6 milhões de casos em 2040, representando um aumento de 57% (OPAS, 2021). Estimativas apontam, ainda, que dos 1,8 milhões de pacientes com câncer nos Estados Unidos, aproximadamente, metade sofrerá com algum quadro de mucosite em diferentes graus de severidade podendo implicar em internações adicionais, impactos negativos no tratamento oncológico, pior qualidade de vida e custos financeiros mais elevados comparados aos pacientes sem essa condição (DI FEDE *et al.*, 2023).

No Brasil, dando ênfase nas abordagens terapêuticas, dados estatísticos disponibilizados pelo DATASUS, Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - Ministério da Saúde, trazem as modalidades cirurgia, radioterapia e, como única terapia anticâncer sistêmica, a quimioterapia. Essa informação indica a relevância da quimioterapia no contexto oncológico, que no SUS, ainda é a principal abordagem sistêmica utilizada representando cerca de 42,29% de casos no ano de 2023 e primeiro semestre de 2024 quando comparados as demais abordagens listadas (DATASUS, 2024). Por consequência, esse tipo de tratamento traz efeitos adversos que podem interferir na escolha da dose do quimioterápico e impactam na qualidade de vida dos pacientes. Financeiramente, apesar de dados limitados quanto aos efeitos adversos, os custos gerais com o tratamento oncológico advindos do SUS representam, anualmente, cerca de 4,5 bilhões em dólares. Esse impacto financeiro é agravado, ainda, se considerarmos o comprometimento da produtividade laboral do paciente devido à condição incapacitante do câncer e das toxicidades advindos do tratamento (SILVA, 2020).

Além dos transtornos, seja no âmbito fisiológico, social e financeiro, há um fator limitante na clínica alusivo ao diagnóstico e tratamento da mucosite intestinal. O ponto crítico referente ao diagnóstico se dá pela presença da diarreia consequente a um processo inflamatório já instalado e de intensidade, muitas vezes, agravada. A pouca acessibilidade da região afetada e com o desenvolvimento de diretrizes ainda escassas, o uso de modelos animais que mimetizem aspectos clínicos e que promovam a possibilidade de investigação de alvos moleculares passíveis de modulação é a principal estratégia disponível para compreender essa patologia.

Nesse ponto, é relevante destacar a participação da via TLR/PI3K/AKT na mucosite induzida por irinotecano, previamente analisada por nosso grupo de pesquisa. Nesse contexto, a isoforma PI3K γ já descrita em contextos inflamatórios e autoimunes pode representar um alvo molecular promissor. Somado a isso, a aprovação na clínica do duvelalisib e estudo de fase II

do IPI-549 traçam possibilidades de futuras aplicações ampliadas desses inibidores no contexto inflamatório mediante avanço da pesquisa pré-clínica em camundongos.

Além da descrição da PI3K γ em contextos inflamatórios e autoimunes, há associação da hiperativação da via da PI3K em diversos tipos de câncer. Por consequência, a inibição de isoformas da classe I seja como pan-inibidores, com inibição de seletividade dual ou específica para cada isoforma são constantemente desenvolvidas em esquemas de tratamento que visam a monoterapia ou a combinação com quimioterapia, imunoterapia e radioterapia.

Desta forma, o presente estudo visou investigar a participação da PI3K γ na patogênese da mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano, utilizando, para tanto, o inibidor seletivo AS-605240. Ademais, foi verificado a possibilidade de efeito sinérgico ao combinar o tratamento do inibidor AS-605240 com o irinotecano no modelo tumoral com células de câncer colorretal. Essa análise além de contribuir para melhor compreensão dos aspectos moleculares no desenvolvimento da mucosite pode gerar impactos na tomada de decisão ao longo do tratamento oncológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da PI3K γ no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano e o potencial de interferência antitumoral entre o inibidor desta enzima e o irinotecano.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar a melhor dose de irinotecano para induzir o modelo de mucosite intestinal;

Avaliar a repercussão da inibição da PI3K γ sobre os parâmetros inflamatórios, morfológicos e funcionais da mucosite;

Verificar os níveis de expressão de citocinas marcadoras da polarização linfocitária na mucosa intestinal ao inibir PI3K γ ;

Testar o potencial antitumoral do inibidor de PI3K γ associado ao irinotecano.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Os protocolos experimentais desse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará protocolada sob o CEUA nº 5132240718 (ID000837). Todos os preceitos considerados para esta aprovação seguiram a 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). O certificado de aprovação encontra-se no ANEXO-A.

Destacamos, ainda, que este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante detinha treinamento e competência para a execução dos procedimentos descritos nos protocolos; e que não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

4.2 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 em gaiolas adequadas, em um ambiente com temperatura controlada (22-25°C), exaustão de ar, ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão, respeitando o número máximo de 6 animais por gaiola.

4.3 Células

Foram utilizadas células tumorais de linhagem murina para câncer colorretal (Mc-38) semeadas em meio DMEM (Biowhittaker®, Lonza) suplementadas com 20% de Soro Fetal Bovino.

4.4 Drogas

Durante a execução dos protocolos utilizou-se: **Cloridrato de Irinotecano** (Trebyxan, Bergamo, 20 mg/mL), **AS-605240** (um inibidor de PI3K γ , Cayman Chemical Company, MI, USA), **cetamina** (100 mg/kg, i.p.), **xilasina** (10 mg/kg, i.p.) e **Tribromoetanol** (2,5%).

4.5 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano

4.5.1 Protocolo I: Definição da dose do irinotecano no modelo de mucosite

Camundongos C57BL/6 machos foram divididos em três grupos (n=6 a 9): veículo (DMSO a 1%, 10 mL/Kg, v.o., uma adm./dia/por seis dias); IRI75 (irinotecano 75 mg/Kg, i.p., uma injeção/dia/por quatro dias) e IRI120 (irinotecano 120 mg/Kg, uma injeção/dia/por quatro dias) (**Fig. 7a**).

4.5.2 Protocolo II: Inibição da PI3K γ no modelo de mucosite induzida por irinotecano

Camundongos C57BL/6 machos foram divididos em três grupos (n=6 a 9): veículo (DMSO a 1%, 10 mL/Kg, v.o., uma adm./dia/por seis dias); IRI120 (irinotecano 120 mg/Kg, uma injeção/dia/por quatro dias) sozinho ou em combinação com o inibidor de PI3K γ , AS-605240 (10 mg/Kg, v.o., uma adm./dia/por seis dias) (**Fig. 7b**).

4.5.3 Protocolo III: Potencial antitumoral do inibidor de PI3K γ , AS-605240, associado ao irinotecano

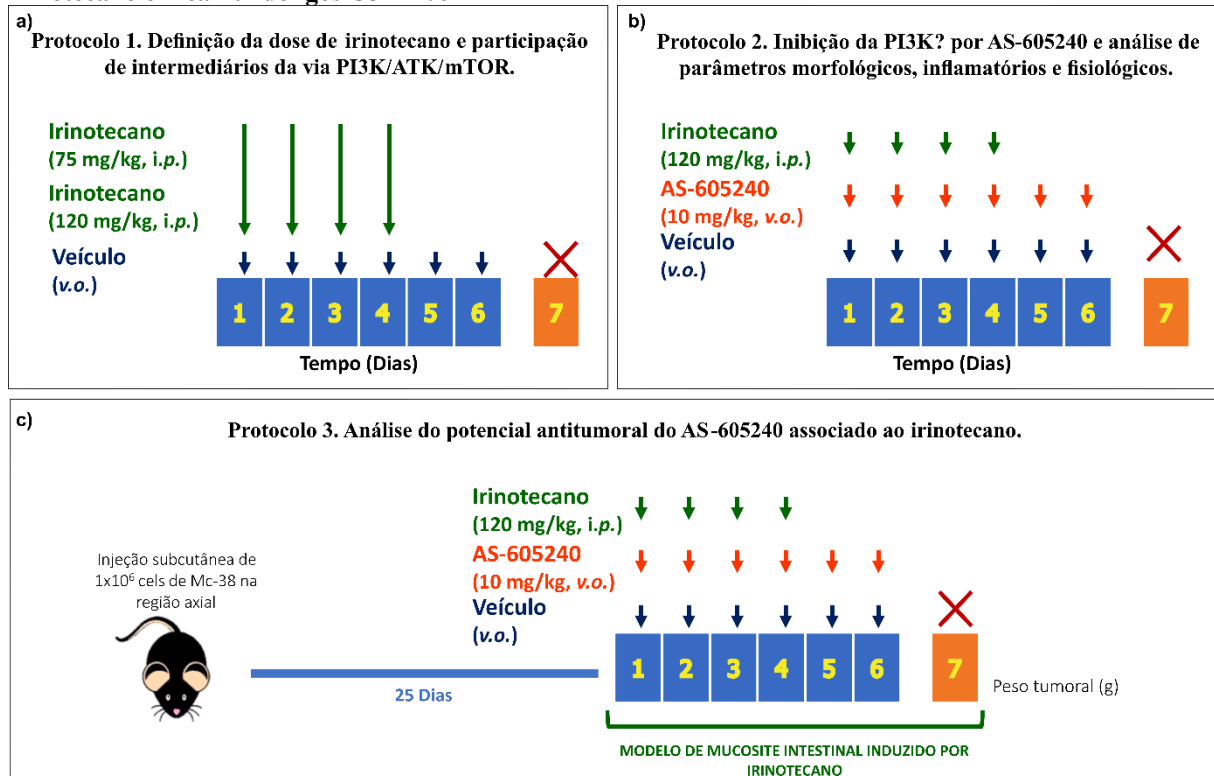
Células Mc-38 (1×10^6) foram injetadas por via subcutânea na região axilar de camundongos C57BL/6 (SECOMBE *et al.*, 2022). Após 25 dias, com os tumores visíveis e palpáveis, os animais foram divididos, de forma aleatória, em quatro grupos (n=6 a 8): veículo (DMSO a 1%, 10 mL/Kg, v.o., uma adm./dia/por seis dias); IRI120 (irinotecano 120 mg/Kg, uma injeção/dia/por quatro dias), AS-605240 (10 mg/Kg, v.o., uma adm./dia/por seis dias) sozinho ou em combinação com IRI120 (**Fig. 7c**).

4.5.4 Resumo do fluxo de trabalho

O modelo murino de mucosite induzido por irinotecano adaptado por Melo e colaboradores (2008) é desenvolvido em sete dias. Nesse modelo, as administrações do irinotecano são feitas por via intraperitoneal durante quatro dias, com a eutanásia dos animais no sétimo dia após a primeira dose do quimioterápico para a coleta de material biológico. No **protocolo I**, foi estabelecido a melhor dose de irinotecano (IRI75 e IRI120) para o desenvolvimento da mucosite intestinal na matriz de animais utilizadas nesse estudo. Além disso, foi analisado o perfil de expressão de intermediários da via da PI3K/AKT/mTOR nessas diferentes concentrações. Já no **protocolo II**, parte dos animais foi submetida ao tratamento com o inibidor de PI3K γ , AS-605240, diariamente durante seis dias por via oral. As administrações ocorreram sempre 1 hora antes das injeções de irinotecano. Finalmente, no **protocolo III** foi verificado o potencial sinérgico antitumoral entre o AS-605240 e o

irinotecano. Após a injeção de células Mc-38 e o estabelecimento da massa tumoral após 25 dias, os animais foram submetidos ao modelo de mucosite de forma similar ao protocolo II e, no sétimo dia ocorreu a excisão e pesagem dos tumores.

Figura 7: Protocolos experimentais desenvolvidos para o modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos C57BL/6



Fonte: Autora

4.6 Avaliação ponderal

Os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em % de ganho ou perda de peso.

4.7 Contagem de leucócitos totais

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol para coletar aproximadamente 20 μ L de sangue por punção do plexo retro-orbital com auxílio de um tubo capilar heparinizado (dimensões: diâmetro interno de 1,1mm-1,2mm; diâmetro externo de 1,5mm-1,6mm). O sangue coletado foi diluído imediatamente em 380 μ L da solução de Turk (Ácido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%). Em seguida, o número total de leucócitos plasmáticos foi contabilizado utilizando a câmara de Neubauer em microscópio ótico (100x). Os resultados foram expressos n^o células/mm³ a partir do somatório de leucócitos totais dos quatro quadrantes multiplicados pelo fator de correção da câmara.

4.8 Avaliação de parâmetros inflamatórios

4.8.1 Expressão gênica por PCR em Tempo Real

As amostras do terço final do intestino (correspondente ao íleo) foram trituradas no TissueLyser LT (Quiagen) usando *beads* de aço (4,5mm) imersos em 1mL de Trizol. A homogeneização ocorreu em 50 pulsos/segundo por 2 min, havendo necessidade de mais tempo, as amostras retornavam ao gelo por 2 min e eram novamente colocadas no TissueLyser LT. Após a trituração, foi realizada a extração de RNA pelo método do Trizol de acordo com as especificações do fabricante.

A concentração e pureza das amostras foram verificadas em Espectrofotômetro de Microplacas Epoch™ (BioTek). As amostras que tiveram absorvância A260/280 variando de 1,5 a 2,0 foram consideradas adequadas para o estudo, bem como as amostras com concentração superior a 100 ng/uL. A transcrição de RNA em DNA complementar foi realizada com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, usando o Veriti 96 Thermocycler, ambos da Applied Biosystems. Ao término da transcrição reversa, todas as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

Tabela 3: Sequência/Identificação dos alvos usados na análise de expressão genica por qRT-PCR.

FLUORÓFORO	GENE	SEQUÊNCIA / ID
TaqMan	<i>Pik3cg</i>	Mm80445038 m1
	<i>Pik3cd</i>	Mm00435674 m1
	<i>Tlr2</i>	Mm01213946 m1
	<i>Tlr4</i>	Mm00445273 m1
	<i>Tlr9</i>	Mm07299609 m1
	<i>Il18</i>	Mm00434226 m1
	<i>Il33</i>	Mm00505403 m1
	<i>β-actin</i>	Mm02619580 g1
	SyBr Green	<i>Mtor</i>
Reverse 5'-CGGATGTGGCTCTTCACAAA-3'		
<i>Aim2</i>		Forward 5'-TGGAGGTCACCAGTTCCTCA-3'
		Reverse 5'-TTCCTCTGTTATCTTCTGGACTTT-3'
<i>Il12b</i>		Forward 5'-AAGTGTGAAGCACCAAATTACTC-3'
		Reverse 5'-TTCAAGTCCATGTTTCTTTGC-3'
<i>Infg</i>		Forward 5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'
		Reverse 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
<i>Il4</i>		Forward 5'-TAGTTGTCATCTGCTCTT-3'
		Reverse 5'-CTACGAGTAATCCATTG-3'
<i>Cxcl1</i>		Forward 5'-CGAGCCACACTCCAACACAGC-3'
		Reverse 5'-AGGGAGCTTCAGGGTCAAGGC-3'
<i>Tgfb</i>		Forward 5'-TTTGGAGCCTGGACACACAG-3'
		Reverse 5'-AGCTTTCCTCCGCATTGA-3'
<i>β-actin</i>		Forward 5'-GACATGGAGAAGATCTGGCA-3'
	Reverse 5'-GGTCCTTTACGGATGTCAACG-3'	

Finalmente, o qRT-PCR foi realizado usando PowerUp SyBr Green Master Mix ou TaqMan, conforme detalha a tabela 3. Para cada alvo analisado foi utilizado 1µg de cDNA. As

PCRs foram feitas no QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Scientific) e, o processo de amplificação foi realizada usando o modo de ciclagem rápida de acordo com as especificações do fabricante. Vale destacar, que para a amplificação dos alvos com SyBr Green foi realizado a curva de *melting* para verificar inespecificidade dos primers ou possíveis contaminações. A análise de expressão genica foi realizada usando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.8.2 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, cuja presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de ELISA. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por Bradley et al., (1982), utilizando 0,0008% de peróxido de hidrogênio como substrato para a MPO.

Em síntese, uma amostra do terço final do intestino delgado foi coletada, pesada, imersa em solução NaCl e EDTA dissódico diluídos em Tampão Fosfato (0,02M) e triturada em TissueLyser LT da Quiagen usando *beads* de aço de 4,5 mm. As amostras foram, então, centrifugadas (3000 rpm, 15 min, 4°C) com posterior descarte do sobrenadante, ressuspensão do *pellet* em NaCl 0,02%, homogeneização em vórtex e centrifugação (3000rpm, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi novamente descartado e, o precipitado foi ressuspensão em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), homogeneizado e centrifugado (10000 rpm, 15 min, 4°C). Após fazer a curva padrão e o plaqueamento de 50 µL do sobrenadante em placas de 96 poços, foi adicionado 25 µL de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e 100 µL de H₂O₂ que foi incubado a 37°C por 5 min. Em seguida, a reação foi parada com 75 µL de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) 4M. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 mmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto.

4.8.3 Atividade da malondialdeído (MDA)

A determinação dos níveis de peroxidação lipídica envolve a degradação oxidativa de ácidos graxos e pode ser medida por seus produtos de reação, onde o malondialdeído (MDA) é um dos produtos secundários mais conhecido e utilizados como indicador de injúria da membrana celular. A reação envolve MDA e tiobarbitúrico (TBA2) formando complexo MDA-TBA2 que é detectado por espectrometria.

As amostras do intestino foram trituradas no TissueLyser LT da Quiagen usando *beads* de aço de 4,5 mm em solução de tampão fosfato 0,05 M a 10% (mg de tecido/ μL), 250 μL do homogenato foi incubado em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Em seguida, a fim de interromper o processo de peroxidação, foi adicionado 400 μL de ácido perclórico 35% às amostras com posterior centrifugação (14.000 rpm, 15 min, 4 °C). Em seguida, foi coletado 600 μL do sobrenadante e adicionado 200 μL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa solução foi incubada em banho-maria a 95-100 °C por 30 min. Após resfriamento, as amostras foram plaqueadas e uma curva-padrão com tetrametoxi-propano (TMP) foi utilizada para calibração do método. As absorvâncias foram mensuradas no comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mg de tecido.

4.8.4 Ensaio da glutathiona reduzida (GSH)

Foi determinado a glutathiona reduzida, antioxidante hidrossolúvel componente endógeno do pool dos grupos sulfidrílicos não-proteicos (NPSH), de acordo com o método de (SEDLAK; LINDSAY, 1968) que é fundamentado na reação do DTNB (ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico) com compostos de sulfidrina. Em resumo, amostra de intestino foram trituradas no TissueLyser LT da Quiagen usando *beads* de aço de 4,5 mm com tampão EDTA 0,02 M, no volume de 10% em relação ao peso do fragmento do intestino. Em seguida, foi adicionado 60 μL de ácido tricloroacético (TCA) 10% a 40 μL de amostra e então foi centrifugado em 5000 rpm, 15 min, 4°C. O sobrenadante foi plaqueado (60 μL), bem como a curva-padrão com glutathiona reduzida. Por fim, foi adicionado 102 μL da solução de leitura (Tris- EDTA, DTNB 0,01 M) e a absorvância foi mensurada no comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em μg de NP-SH/mg de tecido.

4.8.5 Imunofluorescência

Foram obtidos cortes do terço final do intestino, correspondente ao íleo, a partir de tecidos fixados em parafina. As lâminas contendo os cortes foram mantidas em estufa por 1 hora a 60°C, seguido por dois banhos em Xilol por 10 minutos para desparafinação dos tecidos. O excesso de Xilol e hidratação dos tecidos foi feito por banhos sucessivos de Etanol em concentrações decrescente de, a saber: 2 banhos de 10 min de Etanol absoluto; 1 banho de Etanol a 90%, 70%, 50% por 5 minutos, nessa ordem. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente por 10 min, seguido por 3 banhos de PBS por 5 min, cada. A recuperação antigênica foi feita em Tampão Citrato de Sódio 0,1 M (pH 6,0), à temperatura de 95 °C, por 30 minutos, seguida de resfriamento, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após essa

etapa foi feito 3 banhos de 5 min de PBS. A permeabilização das membranas foi feita em solução contendo 200 µL de PBS, 4 mL de Albumina Sérica Bovina (BSA) 5% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e 200 µL de triton X-100 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) durante 10 min. Em seguida, foram feitas 3 lavagens com PBS de 5 min cada. O Bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com Glicina 0,3 M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) em BSA 5% por 30 min. Os tecidos foram incubados em temperatura de 2 – 4°C, overnight, com os anticorpos primários feitos em coelho anti-pAKT (1:400), anti-F4/80 (1:300) e anti-FOXP3 (1:300), ambos da Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, EUA. Completado o tempo de incubação do anticorpo primário, foi feita 3 lavagens de 5 min com PBS para posterior incubação com o anticorpo secundário de donkey, anti-igG de coelho, Alexa Fluor 568 (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) durante 1 hora e 30 min na mesma concentração estabelecida para o anticorpo primário. A partir desse ponto, as etapas que sucedem foram feitas protegidos da luz. Após o término da incubação do anticorpo secundário, foi feita 3 lavagens com PBS durante 5 min, cada. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Invitrogen®, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) (4 µL em 200 mL de PBS) durante 30 min, seguido por lavagens sucessivas em água destilada, totalizando 3 lavagens de 5 min cada. 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 um microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

As imagens obtidas foram analisadas através de um “software” de imagem (Fiji Image J, National Institutes of Health, Washington, DC, EUA). A quantificação da área fluorescente foi feita por diferenciação dos pixels fluorescentes relacionados a fluorescência vermelha (Alexa Fluor 594) e a coloração azul para a identificação dos núcleos celulares marcados com o DAPI. Foram estabelecidos limiares de cores de detecção, estes foram padronizados em todas as quantificações. Os dados obtidos foram expressos em área de fluorescência por meio da comparação da intensidade de fluorescência do marcador alvo com o DAPI (100%).

4.8.6 Dosagem de citocinas IL-1 β e IL-6

As amostras referentes à porção distal do intestino delgado foram armazenadas a -80°C até o dia do ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado de acordo com método descrito

por (SAFIEH-GARABEDIAN *et al.*, 1995). Os tecidos foram triturados no TissueLyser LT da Qiagen usando *beads* de aço de 4,5 mm em solução de PBS (pH 7,4) no volume de 10% referente ao peso do tecido (mg de tecido/ μ L). Em seguida, foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 min. Após essa etapa, o sobrenadante foi coletado. Em placas de 96 poços foi incubados *overnight* os anticorpos IL-1 β e IL-6 (kits da R&D systems). No dia seguinte, as placas foram lavadas com Tampão PBS/TWEEN-20 e foi feito o bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 1% por 1 hora. Após esse tempo, foram feitas lavagens para retirar o excesso de BSA. Nesse ponto, as amostras juntamente com a curva padrão foram incubadas por 2 horas a 4°C. Após a etapa de incubação as placas foram lavadas e o anticorpo de detecção foi adicionado e incubado por 2h. Ao término dessa etapa, as placas foram lavadas e, 100 μ L do complexo HRP-streptavidina diluído (1:40) foi adicionado. Decorridos 20 minutos, 100 μ L do substrato de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foi adicionado e as placas foram incubadas na ausência de luz a temperatura ambiente por 20 min. A reação enzimática foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄ (2N) e então a leitura das absorbâncias foi mensurada em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. As concentrações de citocinas foram calculadas a partir de uma curva padrão. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mg de tecido.

4.9 Avaliação dos parâmetros morfológicos

Após a eutanásia dos animais por dose excessiva de anestésico, foi removido um segmento de 0,5 cm do íleo do camundongo. A seguir, essas amostras foram fixadas em Formol tamponado 10% e processadas para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica 400x (Microscópio Nikon com objetiva 40x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x).

4.9.1 Avaliação da relação Vilo/cripta

Para análise morfológica, foram obtidas as medidas das vilosidades, consideradas desde o ponto de encontro entre duas vilosidades até o topo da vilosidade em questão (parâmetro altura da vilosidade), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre duas vilosidades medidas até o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade absorptiva (razão altura das vilosidades/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento das vilosidades intestinais e as criptas foi calculada em μ m utilizando-se o software ImageJ versão 1.36. Foram medidos de 5 a 10 vilosidades e criptas por corte histológico.

4.9.2 Escores histopatológicos

A gravidade da toxicidade intestinal foi avaliada por um patologista, análise cega, seguindo os escores de gravidade descritos anteriormente (MACPHERSON; DIGESTION; 1978, 1978):

Grau 0, sem lesão;

Grau 1, <10% das criptas com células necróticas;

Grau 2, > 10% das criptas com células necróticas, mas a arquitetura da cripta intacta;

Grau 3, > 10% criptas com células necróticas, perda focal da arquitetura de cripta (<20%), vilosidades encurtadas e hipertrofia variável/hiperbasofilia aparente nas células restantes da cripta;

Grau 4, o mesmo que o grau 3, exceto em relação à perda de arquitetura de cripta e encurtamento de vilosidades mais extensas.

4.10 Avaliação dos parâmetros funcionais

4.10.1 Coloração com Alcian Blue-PAS e histologia quantitativa das células caliciformes

Cortes histológicos da região correspondente ao terço final do intestino foram mantidos em estufa a 60 °C por 60 minutos. Em seguida, foram realizados banhos em Xilol (2 banhos) e, banhos com concentrações decrescentes de Etanol 99%, 95% e 70% por 5 min, finalizando com uma passagem em água corrente e 1 minuto em água destilada. Finalmente, as lâminas foram coradas seguindo as especificações do HistokitTM da EasyPath/ Diagnósticos-Grupos Erviegas. As colorações ocorrem de forma separada, com as mucinas ácidas coradas em azul e as mucinas neutras coradas em magenta.

Em seguida, foi realizado a quantificação das células caliciformes considerando 15 vilosidades e criptas por secção, com a análise conduzida de forma cega (BARCELO *et al.*, 2000; STRINGER *et al.*, 2009).

4.10.2 Avaliação da diarreia

Os eventos de diarreia, foram observados diariamente após a administração do irinotecano e atribuídos escores (KURITA *et al.*, 2000) com adaptações, conforme descrito a seguir:

Escore 0 = fezes com aspecto normal;

Escore 1 = fezes levemente alteradas, pouco umedecidas;

Escore 2 = fezes úmidas com pouca sujidade perianal;

Escore 3 = fezes úmidas com bastante sujidade perianal.

Escore 4 = óbito do animal

Vale salientar que, na ausência dessas características, foi estabelecido um escore no último dia que leva em consideração os aspectos macroscópicos do intestino durante o processo de eutanásia. A distribuição das fezes ao longo do intestino, hiperemia e aspecto de intestino friável foram as principais observações analisadas e, seguiram as indicações dos escores citados acima. Em conjunto, esses parâmetros representam um indicativo de indução da toxicidade gastrointestinal.

4.11 Peso tumoral

Os animais provenientes do protocolo III, submetidos à inoculação de células Mc-38, foram eutanasiados no sétimo dia após a injeção de irinotecano. Os tumores foram excisados e o peso úmido foi verificado em balança analítica.

4.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com o software GraphPad Prism, versão 9.0. Foi realizado teste de normalidade Shapiro Wilk com posterior aplicação de ANOVA seguido de pós-teste Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunn conforme propriedade. Para a análise de curvas temporais, foi realizado o teste two-way ANOVA. Os valores foram expressos como média \pm EPM (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo -máximo) (variáveis sem distribuição normal). As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

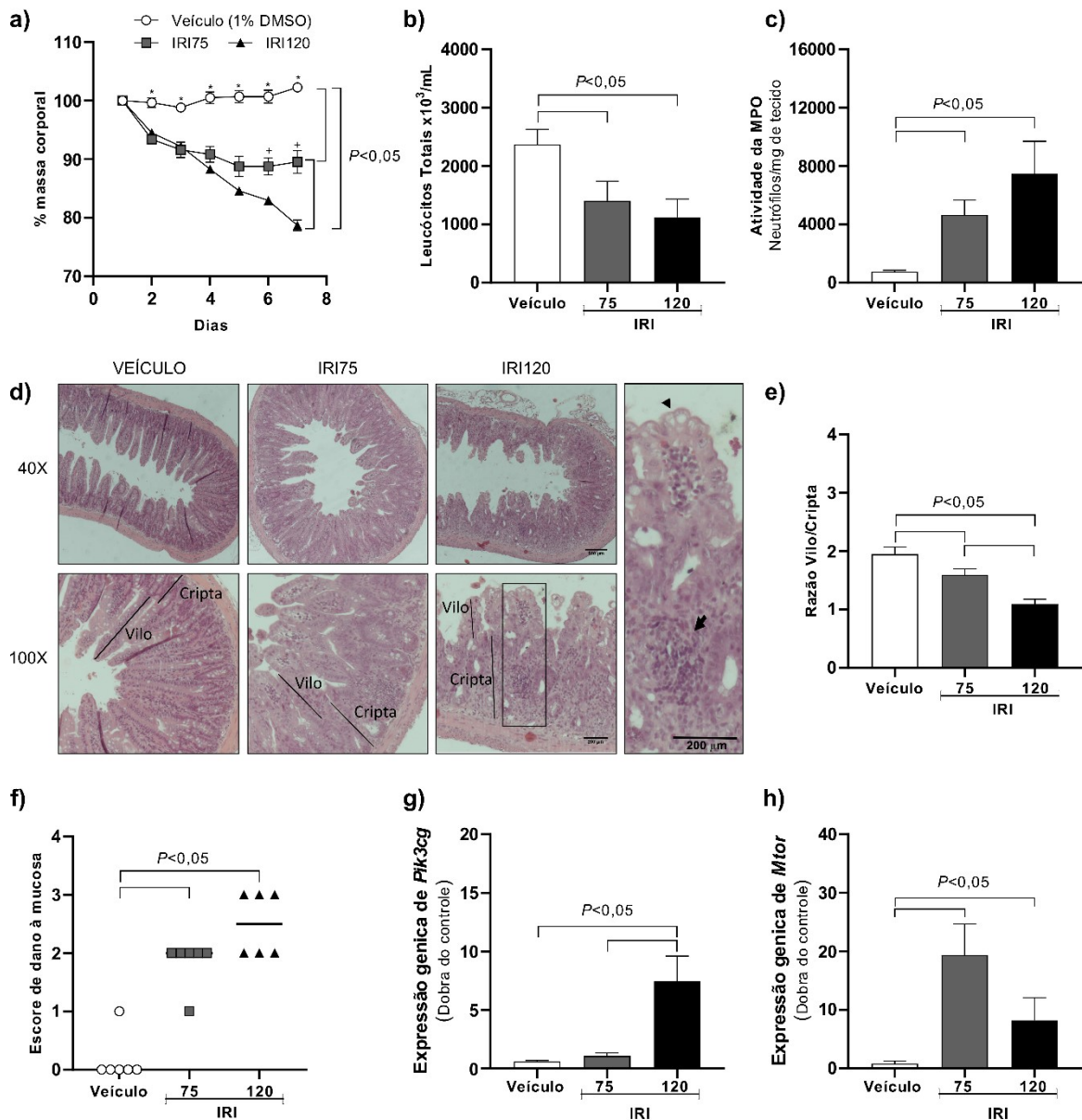
5.1 A via PI3K/AKT/mTOR participa da lesão intestinal no modelo de mucosite por irinotecano

A mucosite intestinal induzida por irinotecano ocorreu, em alguns parâmetros, de forma dose e tempo dependente. Dentre esses parâmetros está a perda de massa corporal que foi percebida a partir do segundo dia após a primeira administração de irinotecano, alcançando, no sétimo, a diferença de 10% de perda ponderal no grupo IRI75 e 20,3% no grupo IRI120 comparados ao grupo veículo. Adicionalmente, a diferença de perda de peso entre os grupos IRI 75/120 foi percebida no sexto dia (**Fig.8a**). A administração de irinotecano levou, ainda, à leucopenia (**Fig.8b**), acúmulo de neutrófilos (**Fig.8c**), injúria intestinal marcada por achatamento das vilosidades, vacuolização celular (**Fig.8d**), redução da relação Vilo/Cripta (**Fig.8e**) e escores histopatológicos agravados (IRI75: 2[1-2] e IRI120: 3[2-3]) (**Fig.8f**). Notavelmente, a injeção de irinotecano aumentou em até 10 vezes a expressão de *Pi3kcg* (**Fig.8g**) e *Mtor* (**Fig.8h**) comparados ao grupo veículo.

A participação da PI3K γ no modelo de mucosite intestinal induzida por Irinotecano foi verificada, inicialmente, por parâmetros histológicos que demonstraram redução parcial dos escores histopatológicos (1[1-2]) comparado ao grupo IRI120 (2[1-2]) (**Fig.9a**). O tratamento com o inibidor de PI3K γ (AS-605240) reverteu danos intestinais em análise da razão vilo/cripta (**Fig.9b**), além de reduzir infiltrado inflamatório, promover a manutenção da organização da cripta e altura das vilosidades em relação ao grupo IRI120 (**Fig.9c**).

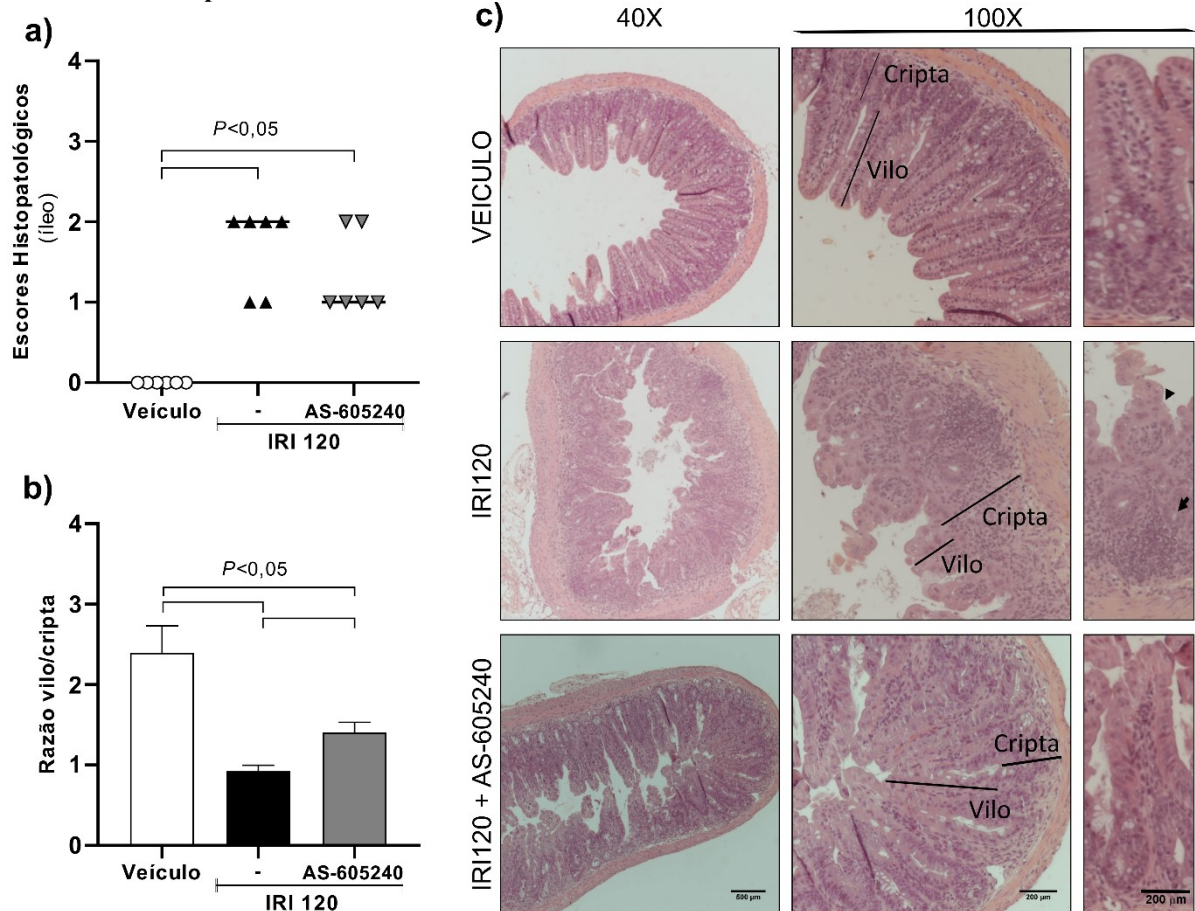
A lesão intestinal no grupo IRI120 promoveu o aumento da expressão dos genes *Aim2* (aumento de 10 vezes), *Tlr2* (aumento de 2 vezes), *Tlr4* (aumento de 12 vezes) e *Tlr9* (aumento de 21 vezes) ambos relacionados ao reconhecimento de DAMPs e PAMPs. Exceto para o gene *Aim2*, o bloqueio com AS-605240 reduziu em até 40% a expressão dos receptores do tipo Toll se comparados com o grupo sem tratamento (IRI120) (**Fig.10 a-d**). Seguindo a via de sinalização molecular à jusante a PI3K γ , constatamos uma diminuição da fosforilação de AKT ao tratar os animais com AS-605240 (**Fig.11a-b**) representando uma redução de 65% da área de fluorescência comparado ao grupo IRI120.

Figura 8: A mucosite intestinal induzida por irinotecano aumenta a expressão de intermediários da via PI3K/AKT/mTOR.



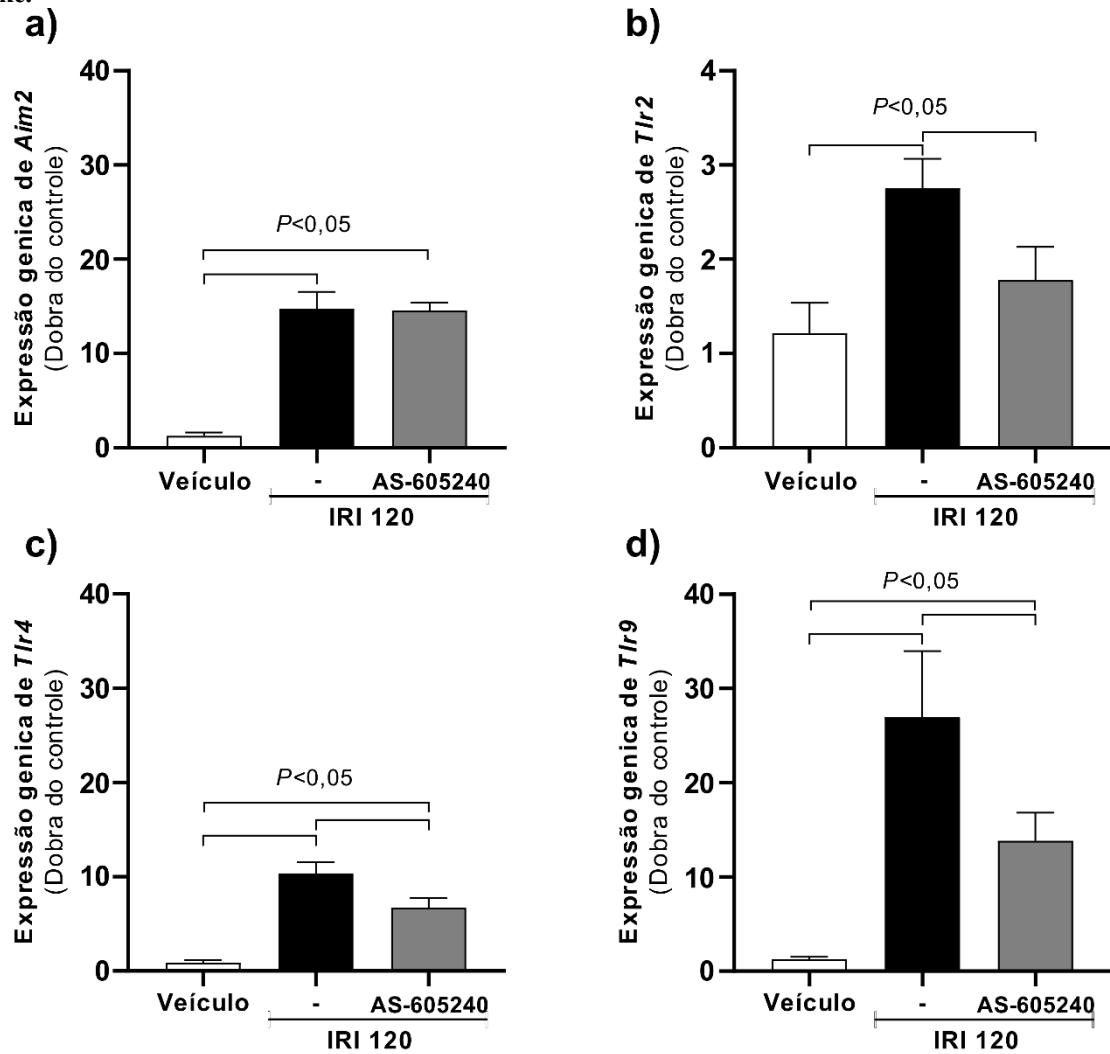
Camundongos machos C57BL/6 (20-22g, $n=6$ a 9 por grupo) receberam veículo (1% DMSO, 10 mL/kg, v.o.) ou Irinotecano (IRI 75 ou 120 mg/kg/4 dias, i.p.). O tratamento com Irinotecano promove perda de peso corporal (a), leucopenia (b) e aumento da atividade da mieloperoxidase (IRI75 e IRI120) (c). A morfologia intestinal no dia 7 mostra o grupo veículo com morfologia normal e, os grupos IRI75 e IRI120 com infiltrado inflamatório em diferentes proporções. Destaque para a ampliação do grupo IRI120 com presença de achatamento das vilosidades, vacuolização celular (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório (seta). A imagem mostra ampliação de 40X (painéis superiores, escala de 500 μm) e ampliação de 100X (painéis inferiores e painel à direita, escala 200 μm) (d). A relação vilo/crípta traz diferenças entre os 3 grupos analisados, com menor relação vilo/crípta no grupo IRI120 (e). O escore de dano à mucosa mostra diferença entre o grupo veículo e os grupos com Irinotecano (IRI75 e IRI120) (f). Na análise de qRT-PCR há níveis aumentados de expressão dos genes PI3K γ (g), e mTOR (h) na presença de Irinotecano. Os dados de expressão gênica foram normalizados com B-ACT. Os gráficos representam a média \pm SEM dos resultados, exceto o gráfico (f) que representa a mediana dos dados. A significância estatística entre os grupos foi estabelecida em $P < 0,05$ e denotada por \sim , * e +.

Figura 9: O inibidor de PI3K γ (AS-605240) atenua alterações morfométrias no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano.



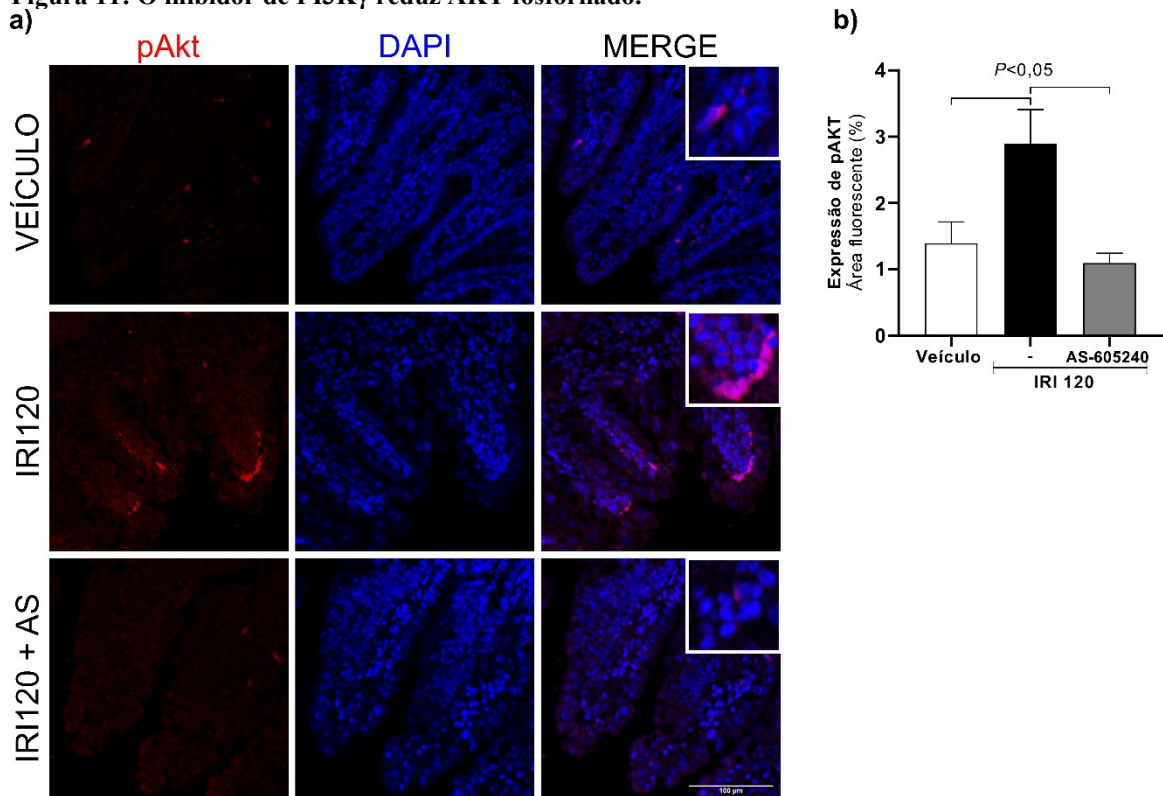
Camundongos machos C57BL/6 (20-22g, n=6 a 9 por grupo) receberam veículo (1% DMSO, 10 mL/kg, v.o.), Irinotecano (120 mg/kg/4 dias, i.p.) ou AS-605240 (10 mg/kg/6dias, v.o.). O tratamento com AS-605240 ameniza os escores de danos histopatológicos **(a)** e reverte danos morfométricos na análise da relação vilo/cripta **(b)**. A morfologia intestinal mostra grupo IRI120 com infiltrado inflamatório, desorganização da cripta (seta) e achatamento dos vilos (cabeça de seta). Já no grupo tratado com AS-605240 combinado com o irinotecano, a estrutura vilo/cripta apresenta similaridade ao grupo controle **(c)**. A imagem mostra ampliação de 40X (painéis à esquerda, escala de 500 μ m) e ampliação de 100X (nos dois painéis à direita, escala de 200 μ m) com destaque para imagens representativas da formação vilo/cripta dos grupos analisados. Os gráficos representam a mediana para os dados de escore histopatológico e a média \pm SEM para os dados de razão vilo/cripta. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

Figura 10: O inibidor de PI3K γ atenua o dano intestinal reduzindo a expressão de receptores do tipo Toll-like.



Os níveis de expressão do gene *Aim2*, receptor imune inato citosólico que reconhece DNA de fita dupla (dsDNA), se mantem no grupo AS-605240 (a) contudo, a expressão de genes importantes para o reconhecimento de DAMPs e PAMPs como os receptores do tipo Toll-like, *Tlr2* (b), *Tlr4* (c) e *Tlr9* (d), apresentam redução significativa no grupo AS-605240 quando comparado ao grupo IRI120. Os dados de expressão gênica foram normalizados para B-ACT e mostrados no gráfico como uma dobra sobre o controle (grupo veículo). Os gráficos representam a média \pm SEM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

Figura 11: O inibidor de PI3K γ reduz AKT fosforilado.



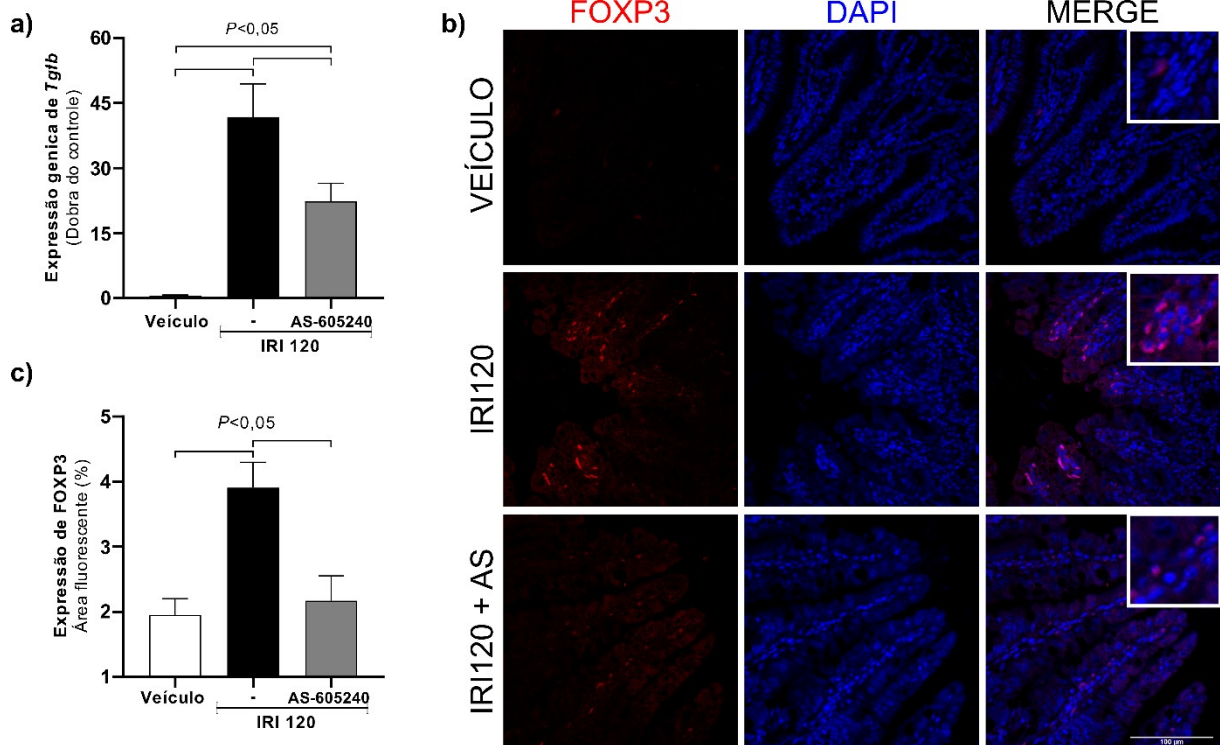
O padrão de expressão de pAKT é observado através de imagens representativas da secção correspondente a terceira porção do intestino (íleo) (a) e por quantificação da área de fluorescência (b). As imagens de imunofluorescência representam escala de 100 μ m (amplificação de 100x). O gráfico de barras representa a média \pm SEM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

5.2 A inibição de PI3K γ altera a polarização de linfócitos no modelo de mucosite intestinal por irinotecano

A resposta inflamatória gerada pelo irinotecano e o tratamento com o inibidor de PI3K γ foi analisada pela expressão de citocinas e migração de células para o íleo. Inicialmente confirmamos o aumento da expressão de *Tgfb* (em até 65 vezes) (Fig.12a) e do fator de transcrição FOXP3 (Fig.12b-c) no grupo IRI120. Esses parâmetros foram reduzidos no grupo tratado com AS-605240, representando uma diminuição de 47,16% na expressão de *Tgfb* e cerca de 44% da área de fluorescência do fator de transcrição FOXP3.

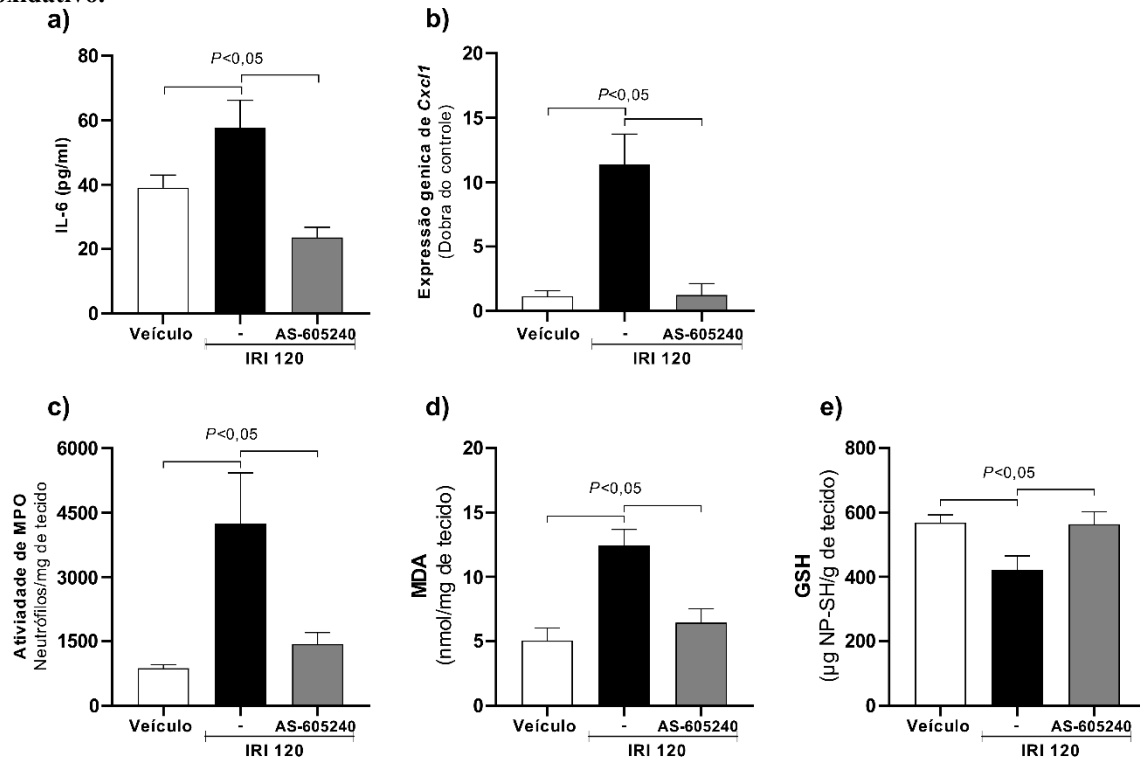
A citocina IL-6 (Fig.13a) e a expressão genica do fator quimiotático *Cxcl1* (Fig.13b) também foram aumentadas pelo irinotecano, contribuindo para o aumento da migração de neutrófilos (Fig.13c), dos níveis de MDA (Fig.13d) e redução dos níveis de sulfidrila não proteicos (glutathiona reduzida) (Fig.13e). Por outro lado, o tratamento com AS-605240 reverteu esses parâmetros.

Figura 12: A inibição de PI3K γ reduz a expressão de FOXP3 e Tgfb.



A expressão gênica de *Tgfb* (a) por qRT-PCR e do marcador de FOXP3 (b e c) por imunofluorescência estão reduzidos no grupo tratado com AS-605240 comparados com o grupo IRI120. Os dados de expressão gênica foram normalizados para B-ACT e mostrados no gráfico como uma dobra sobre o controle (grupo veículo) (a). Os gráficos de barras representam a média \pm SEM dos resultados. Os resultados obtidos pela imunofluorescência estão representados por imagens da secção correspondente a terceira porção do intestino (íleo) com escala de 100 μ m (amplificação de 100x) (b) e por porcentagem da área de fluorescência (c). A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

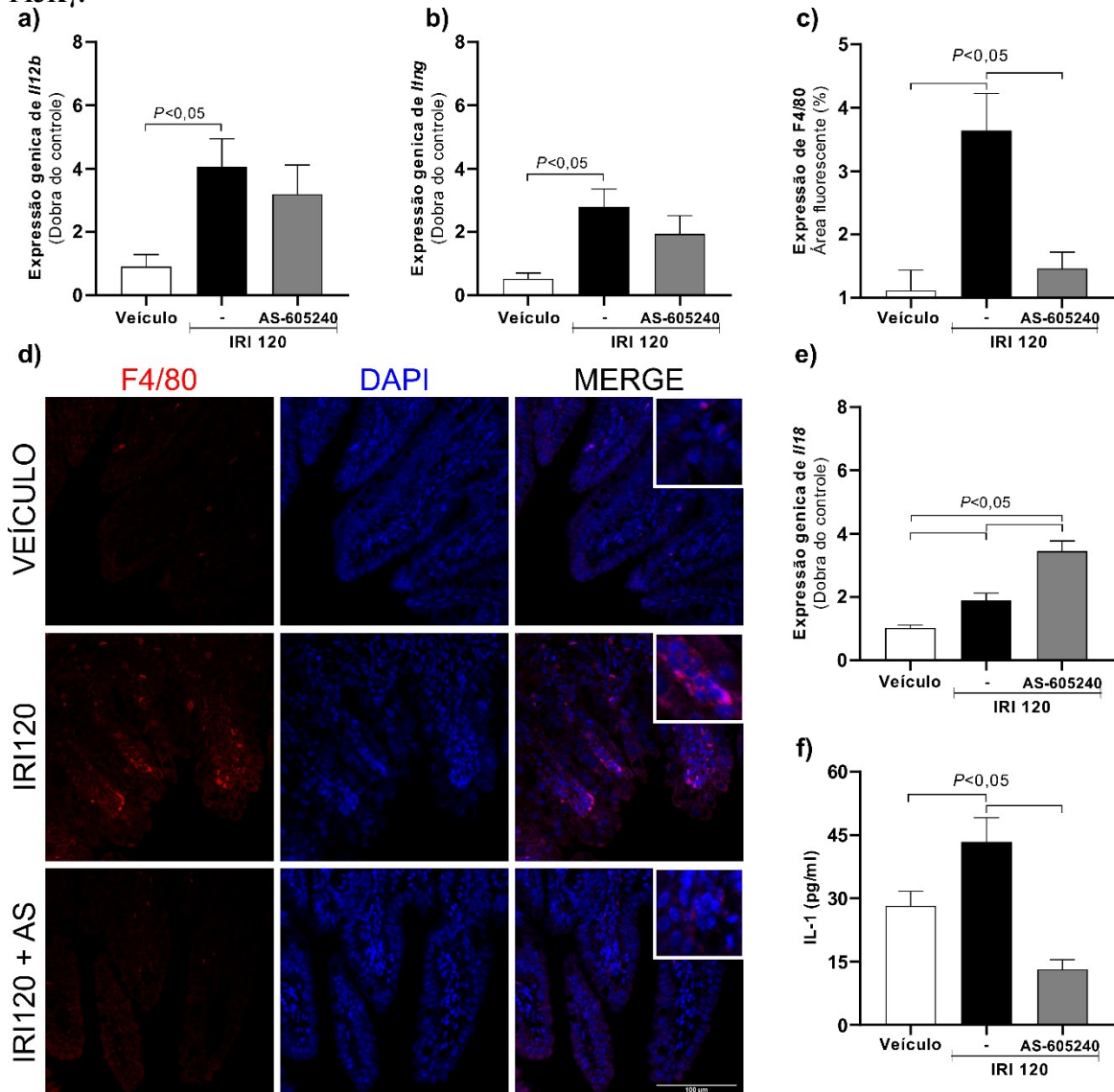
Figura 13: A redução de IL-6 e Cxcl1 no grupo AS-605240 reduz a migração de neutrófilos e o estresse oxidativo.



Os níveis de IL-6 (**a**) e do gene correspondente a quimiocina *Cxcl1* (**b**) no grupo irinotecano promove o aumento a atividade da mieloperoxidase (**c**), dos níveis de malondialdeído (**d**) e redução dos níveis dos grupos sulfidril não proteicos (glutathiona reduzida) (**e**). Por outro lado, o tratamento com AS-605240 reduz esses parâmetros. Os dados de expressão gênica foram normalizados para B-ACT e mostrados no gráfico como uma dobra sobre o controle (grupo veículo) (**b**). Todos os gráficos representam a média \pm SEM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

A exposição ao irinotecano aumentou, ainda, a expressão gênica de *Il12b* (**Fig.14a**) e *Ifng* (**Fig.14b**). O tratamento com o AS-605240, contudo, não alterou a expressão dessas citocinas. Por outro lado, outros parâmetros como a expressão de F4/80 (**Fig.14c-d**), expressão de *Il18* (**Fig.14e**) e IL-1 β (**Fig.14f**) apresentaram diferenças entre esses grupos. Apesar do AS-605240 reduzir em 60% a expressão de F4/80 (2,18% da área de fluorescência no grupo AS-605240) e de IL-1 β (em média de 30,25 pg/mL), a expressão de *Il18* foi aumentada (1,2 vezes) comparado ao grupo IRI120.

Figura 14: A migração de macrófagos e os níveis de IL-1 β são reduzidos no tratamento com o inibidor de PI3K γ .

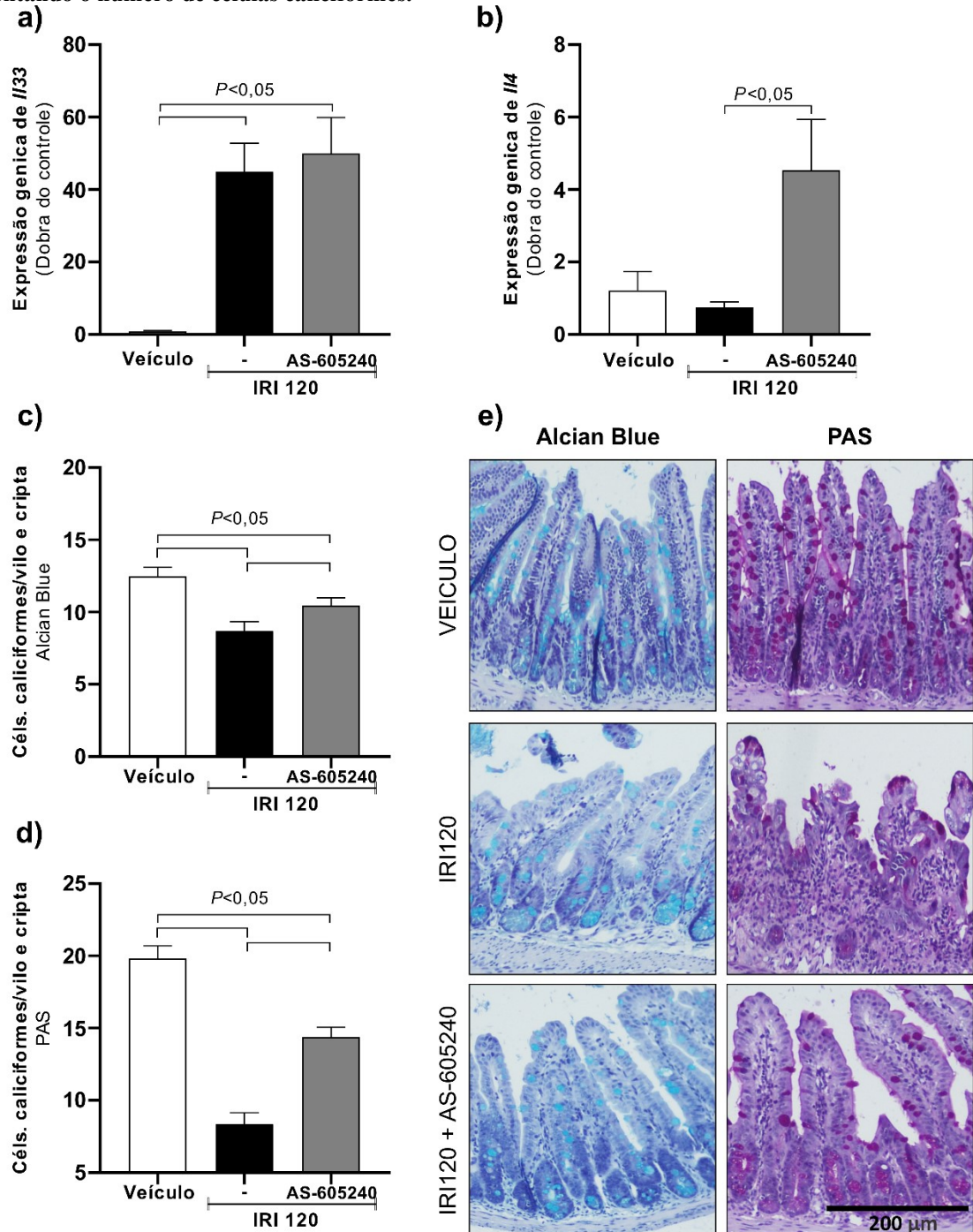


O perfil de expressão genica de *Il12b* e *Ifng* (a e b) não apresenta diferença entre os grupos IRI120 e o grupo tratado com AS-605240. Contudo, tanto a análise quantitativa da área de fluorescência (c) quanto as imagens representativas da secção correspondente a terceira porção do intestino (íleo) (d) mostram uma redução na expressão do marcador de F4/80 no grupo AS-605240. Apesar de IL-18 (e) manter um aumento de expressão genica, os níveis de IL-1 β são reduzidos no grupo AS-605240 (f). Os dados de expressão gênica foram normalizados para B-ACT e mostrados no gráfico como uma dobra sobre o controle (grupo veículo) (a e b). Os gráficos representam a média \pm SEM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

A expressão de *Il33* (Fig.15a) manteve-se em níveis aumentados nos grupos IRI120 (53 vezes) e IRI120+AS-605240 (59 vezes) vs. o grupo veículo, enquanto a expressão de *Il4* (Fig.15b) foi aumentada em cerca de 6 vezes nos animais tratados com AS-605240 comparado ao IRI120. Adicionalmente, o AS-605240 aumentou células calciformes ácidas ($10,5 \pm 4,6$

vs. $8,7 \pm 0,6$) (Fig. 15c e 15e) e neutras ($14,3 \pm 0,6$ vs. $8,3 \pm 0,7$) (Fig. 15d e 15e) sugerindo um mecanismo mediado por linfócitos Th2 na sinalização para a produção de muco intestinal.

Figura 15: O inibidor de PI3K γ aumenta a expressão de citocinas que promovem o perfil Th2, aumentando o número de células caliciformes.

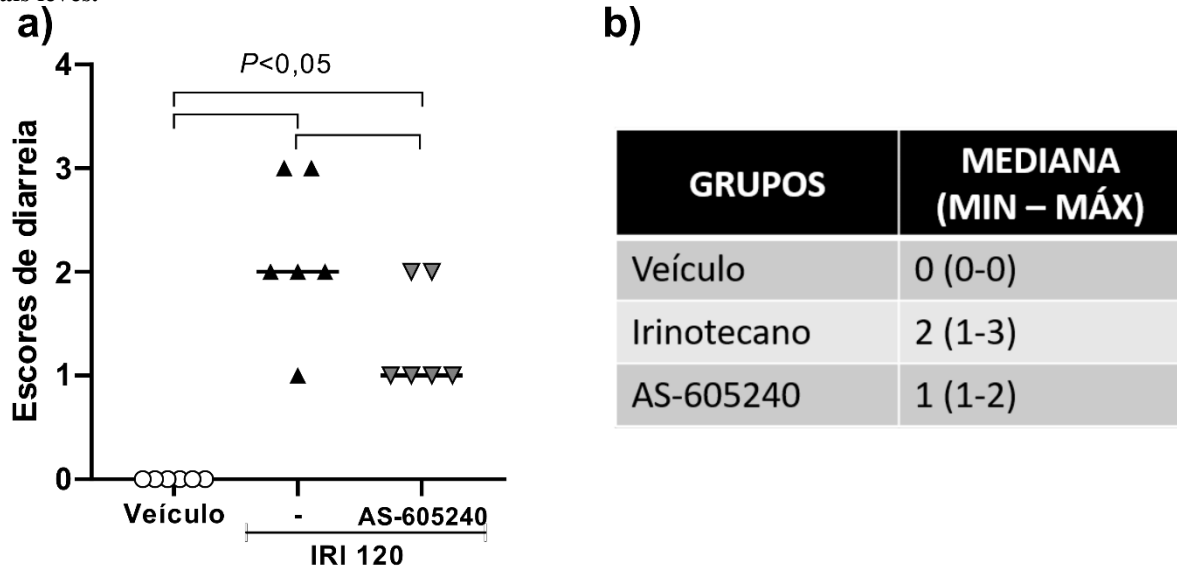


O aumento da expressão de *Il33* (a) e *Il4* (b) no grupo AS-605240 contribuiu para atenuar a redução de células caliciformes ácidas (c) e neutras (d) conforme exemplifica as imagens representativas (e), sugerindo um perfil de resposta Th2. A imagem mostra ampliação de 100X para as células coradas com Alcian Blue (painéis à esquerda) e PAS (painéis à direita). Os gráficos representam a média \pm SEM com significância estatística estabelecida em $P < 0,05$.

5.3 Os escores de diarreia são atenuados ao inibir PI3K γ

Após a análise de parâmetros inflamatórios, verificamos como parâmetro funcional os escores de diarreia e, constatamos que o grupo IRI120 2(1-3) apresentou altos escores de diarreia, enquanto se verificou uma atenuação da gravidade deste parâmetro no grupo AS-605240 1(1-2) (Fig.15a-b).

Figura 16: A inibição de PI3K γ atenua parcialmente a lesão intestinal, detectado pelos escores de diarreia mais leves.



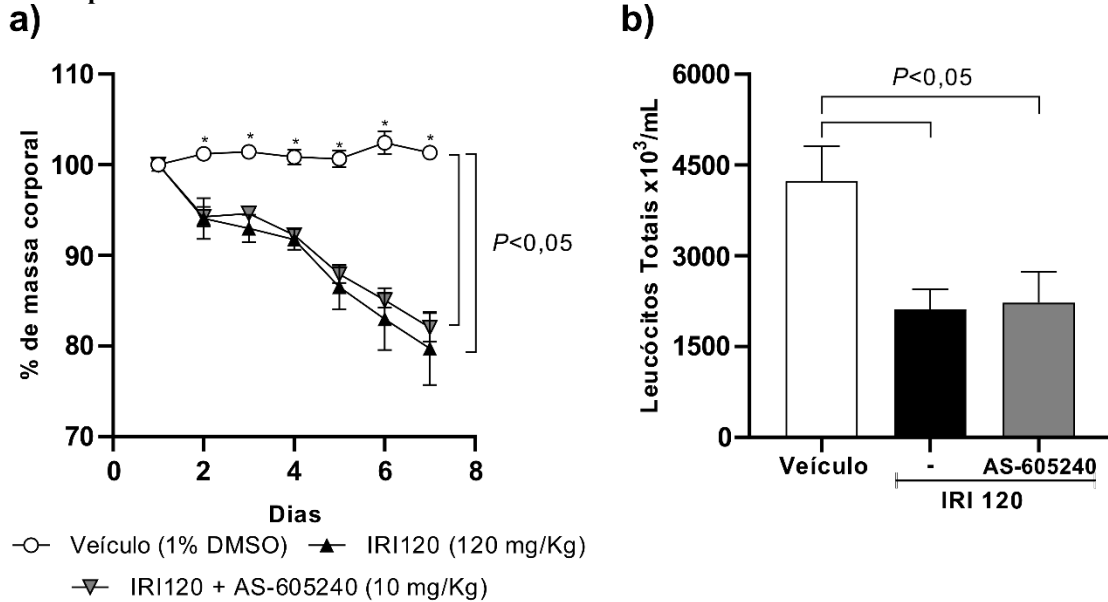
Os escores de diarreia estão apresentados em forma de gráfico (a), com destaque para a mediana dos dados, e de tabela (b) expondo escores máximo e mínimo. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

5.4 A proteção da lesão intestinal ao inibir PI3K γ não compromete o efeito antineoplásico do irinotecano

A capacidade do AS-605240 comprometer a ação antineoplásica do irinotecano foi verificada em diferentes abordagens. Verificamos, a princípio que o tratamento com o AS-605240 não impediu a perda de massa corpórea (Fig.17a), nem o efeito mielotóxico do IRI120 (Fig.17b). Adicionalmente, constatamos que animais tratados com irinotecano e AS-605240 sozinho ou em combinação reduziram o peso tumoral comparado ao grupo Veículo (Fig.18a-b). Contudo, o grupo administrado com a combinação de IRI120 e AS-605240 ($0,45g \pm 0,086$) não apresentou potencialização da redução da massa tumoral comparado ao grupo IRI120

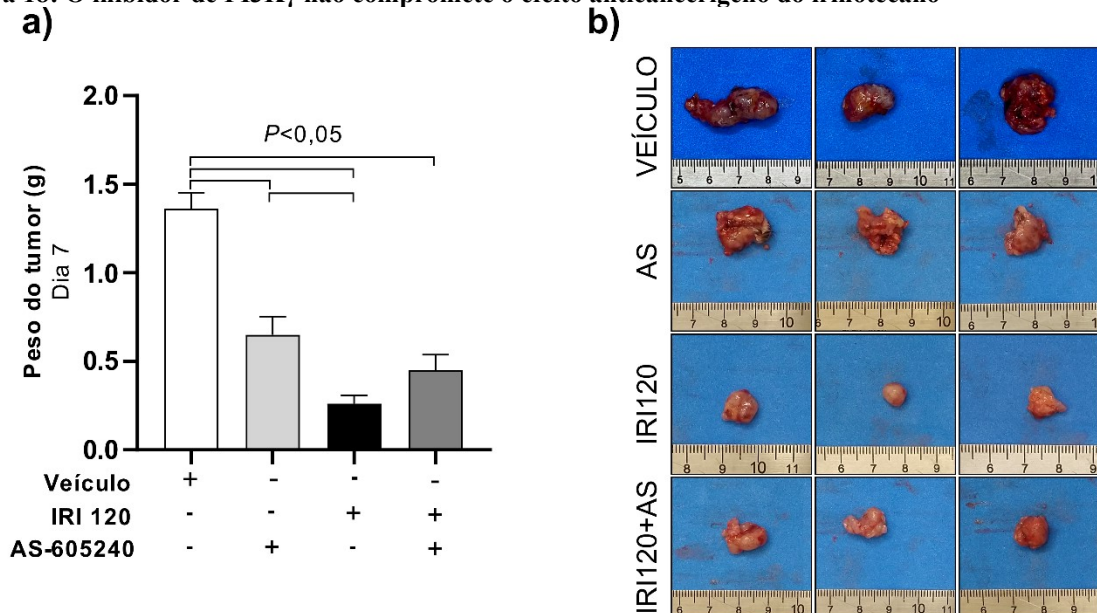
($0,26g \pm 0,046$), indicando que a inibição de PI3K γ não compromete o efeito antitumoral do irinotecano.

Figura 17: A inibição de PI3K γ não interfere na perda de massa corporal ou no perfil mielotóxico induzido por irinotecano.



A porcentagem de massa corporal avaliada diariamente mostra perda de peso a partir do segundo dia com agravamento desse quadro até o último dia de análise nos grupos IRI120 e IRI120+AS-605240 (**a**). Além disso, a inibição da PI3K γ não interferiu no número de leucócitos totais (**b**). Os gráficos representam a média \pm SEM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

Figura 18: O inibidor de PI3K γ não compromete o efeito anticancerígeno do irinotecano



AS-605240 sozinho ou em combinação com o irinotecano diminui o peso do tumor (**a**). Contudo, a combinação, AS-605240/irinotecano, não resulta na potencialização do efeito antitumoral comparado ao grupo que recebeu apenas irinotecano (**a-b**). Os gráficos representam a média \pm SEM dos resultados. A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

A inibição da PI3K γ pelo AS-605240 diminuiu o dano intestinal ao reduzir parâmetros inflamatórios, incluindo a redução da expressão dos receptores do *Toll-Like*, migração de neutrófilos e macrófagos para o intestino, além de alterar o balanço de citocinas em favor de um perfil Th2. Esses mecanismos contribuíram para o aumento de células caliciformes e produção local de muco, atenuando, assim, os escores de diarreia no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano sem comprometer seu efeito antineoplásico. Em conjunto, esses resultados sugerem a participação dessa isoforma na inflamação intestinal, tornando-a um alvo promissor no controle da amplificação da resposta inflamatória.

O tratamento oncológico está relacionado a efeitos adversos ampliando a morbidade e mortalidade e impactando negativamente na qualidade de vida dos pacientes em aspectos no âmbito físico, emocional, social e financeiro (KUDERER *et al.*, 2022). Adicionalmente, efeitos adversos como a mucosite e diarreia são desvantagens significativas que levam à redução ou interrupção do tratamento, com consequente recrudescência tumoral. Essa resposta inflamatória intestinal, induz a lesão tecidual, que culmina com translocação bacteriana sistêmica (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Se considerarmos, especificamente, a mucosite induzida pelo irinotecano, é percebido que a biodisponibilidade deste quimioterápico e do seu metabólito ativo, SN-38, estão diretamente relacionados ao agravo da mucosite. Nesse contexto, a participação da microbiota intestinal é parte fundamental para o agravo dessa condição inflamatória (YUE *et al.*, 2021). Nos últimos anos, o modelo murino de mucosite intestinal por irinotecano desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa descreveu mudanças no perfil inflamatório em condições distintas envolvendo diferentes doses do irinotecano e tempo de intervenção variando de 5 a 7 dias após a primeira injeção desse antineoplásico (Guabiraba *et al.*, 2014; Lima-Júnior *et al.*, 2014; Melo *et al.*, 2008). A escolha da dose nesses estudos considerou aspectos que visavam o teste de mecanismos associados ao agravo ou à proteção da lesão.

No presente estudo, percebemos que a administração de diferentes concentrações de irinotecano promoveu aumento gradual dos danos à mucosa intestinal comprometendo sua integridade morfológica e redução da porcentagem de massa corporal. Outro aspecto observado, foi o aumento de expressão de *Pik3cg* e *Mtor*, onde os níveis dos transcritos de *Pik3cg* foram proporcionais à dose do quimioterápico. Adicionalmente, dentre as doses testadas, a de 120 mg/kg é equivalente a utilizada na clínica (350 mg/m²), permitindo maior

similaridade dos efeitos adversos causados pela administração desse antineoplásico. Em conjunto, esses dados qualificam essa dose como a melhor para o desenvolvimento do modelo a partir dos objetivos propostos.

No contexto inflamatório, o papel imunomodulador da PI3K γ tem sido largamente descrito devido, principalmente, a sua expressão quase que exclusiva ao sistema hematopoiético, em leucócitos (RÜCKLE; SCHWARZ; ROMMEL, 2006). Além disso, sua expressão também é percebida em células estruturais como fibroblastos e células epiteliais apresentando níveis reduzidos em condições fisiológicas (SALA *et al.*, 2021). Portanto, a alteração na expressão da *Pik3cg* verificada mediante tratamento com irinotecano pressupõe sua participação no agravamento da mucosite seja por meio da migração de leucócitos para a área lesada ou pelo aumento da sua expressão nos enterócitos.

Baseado na expressão elevada desta enzima durante a mucosite, hipotetizamos se a inibição da PI3K γ geraria proteção contra o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano. Para isso, tratamos os animais com o inibidor, AS-605240, oralmente ativo e seletivo para a isoforma PI3K γ . De acordo com dados previamente descritos, a dose efetiva do AS-605240 capaz de produzir 50% do efeito desejado (ED50) mostrou alta eficácia com 9,1 mg/kg. Nesse mesmo estudo, foi descrito que o tratamento com 10 mg/kg do AS-605240 e, animais *Pik3cg*^{-/-} apresentaram correlação com a porcentagem de redução da migração de neutrófilos (CAMPS *et al.*, 2005b). Por consequência, ao tratarmos os animais nessas condições e dose, verificamos que os camundongos apresentaram parâmetros histológicos e morfométricos atenuados, caracterizados pela redução da mediana dos escores histopatológicos e reversão dos danos morfométricos sobre a razão vilos/críptas. Essas observações são consistentes ao estudo de lesão intestinal que demonstrou que o tratamento com Resveratrol atenuou a inflamação intestinal após irradiação por meio da modulação da via PI3K/AKT/mTOR (RADWAN; KARAM, 2020), reforçando o papel dessa via na resposta lesiva intestinal.

Os aspectos inflamatórios também foram verificados, inicialmente, por meio da expressão dos receptores TLR e sua relação com a inibição da PI3K γ no curso da mucosite intestinal. Estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram a translocação bacteriana, o aumento da expressão de TLR2 e TLR9 e a importância da sinalização destes no contexto da mucosite (Wong *et al.*, 2015), além da participação do SN-38 como antagonista competitivo para o TLR4 (Wong *et al.*, 2019). No presente estudo, além de confirmarmos o aumento de expressão desses receptores no agravamento da doença, também

verificamos que o bloqueio da PI3K γ reduziu a expressão desses receptores em mais de 40% se comparado ao grupo irinotecano com consequente redução da fosforilação de AKT à jusante à PI3K γ .

Corroborando o acima citado, a literatura indica o papel de TLRs à montante à PI3K γ e sua potencialidade no controle de doenças inflamatórias por meio da reprogramação de macrófagos em um mecanismo dependente do receptor endocítico multifuncional LRP1 (LUO *et al.*, 2018). Adicionalmente, foi descrito em modelo murino de pleurisia induzida por CpG a participação da PI3K γ na inflamação induzida por TLR9. Naquele mesmo estudo foi demonstrado, ainda, que ao inibir PI3K γ em células mononucleadas de sangue periférico estimuladas com CpG houve redução dos níveis de citocinas e de AKT fosforilada (LIMA *et al.*, 2019). Como evidenciado no presente estudo, tais mecanismos parecem ter a mesma dinâmica.

O AKT é uma quinase central que regula diversos processos celulares envolvendo síntese proteica, sobrevivência celular, apoptose, proliferação, autofagia e metabolismo (CHOG; LI; MAIESE, 2005; MANNING; TOKER, 2017). Dessa forma, é recorrente sua participação em diversos contextos patológicos como câncer, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, distúrbios inflamatórios, autoimunes e neurológicos (CAMAYA; DONNELLY; O'BRIEN, 2022; FRUMAN *et al.*, 2017).

Na presente investigação, verificamos o aumento de pAKT nas vilosidades do grupo irinotecano, o que além de indicar sua participação na amplificação da resposta inflamatória, pode sugerir um mecanismo compensatório de sobrevivência celular ao inibir a lesão mitocondrial e o início da apoptose através da fosforilação à jusante de BAD. Essa resposta celular, já foi previamente discutida no modelo de lesão renal que mostrou o efeito protetor da gastrina reduzindo a apoptose ao ativar a via PI3K/Akt/Bad (LIU *et al.*, 2020). Portanto, se considerarmos o efeito protetor de AS-605240 na mucosite, apesar da possibilidade de fosforilação do AKT (AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) e AKT3 (PKB γ))(MANNING; TOKER, 2017) por PI3K distintas carrear esse componente pró-sobrevivência celular, o papel de tal alvo pode envolver sua ação no contexto da resposta imunológica lesiva na patogênese da mucosite.

A resposta anti-inflamatória compensatória diante de uma condição patogênica de natureza inflamatória excessiva também é possível no contexto de células adaptativas. O perfil de células T foi previamente investigado por nosso grupo de pesquisa, que verificou o acúmulo

de células T reguladoras, as quais têm correlação negativa com outras células T auxiliares. Essa é uma indicação de que essas células (Tregs) atuam controlando o dano intestinal induzido pelo irinotecano (FERNANDES *et al.*, 2018). Tal ideia foi confirmada no presente estudo ao demonstrar aumento de expressão gênica de *Tgfb* e dos níveis de FOXP3 no grupo irinotecano, indicando o acúmulo de Tregs. Curiosamente, o bloqueio de PI3K γ reduziu a expressão desses marcadores. Esse achado aparentemente controverso é, na verdade, explicado pela capacidade do AS-605240 reduzir a resposta lesiva pró-inflamatória.

A redução de expressão de TGF- β também foi verificada em diversas abordagens de inibição da PI3K γ , incluindo células pulmonares em modelo de fibrose (WEI *et al.*, 2010), ensaios com cardiomiócitos tratados com doxorubicina (LI *et al.*, 2018) e em modelo de lesão renal por angiotensina II (YU *et al.*, 2018). Além disso, tem sido descrita a participação da via PI3k/AKT/mTOR na regulação do equilíbrio da resposta por células T, incluindo os perfis Th1/Treg no modelo de sarcoidose pulmonar (ZHANG *et al.*, 2019), perfis Th17/Treg na patogênese da doença hepática gordurosa associada a distúrbios metabólicos (MAFLD) (BALLESTRI *et al.*, 2023) e no equilíbrio de Tregs e células autorreativas que regulam o diabetes autoimune (AZZI *et al.*, 2012).

No modelo de mucosite por irinotecano, a mudança de prevalência do perfil Treg nos levou a questionar qual resposta imunológica estaria envolvida na vigência da inibição da PI3K γ . Conforme já descrito, no modelo de mucosite intestinal há acúmulo de células Th17 e consequente infiltrado neutrofílico (FERNANDES *et al.*, 2018). Aqui, confirmamos o aumento da expressão de IL-6, além da quimiocina *Cxcl1* que participa da migração de neutrófilos, bem como o aumento da atividade da mieloperoxidase e dos níveis de Malondialdeído (MDA) com consequente redução dos níveis de glutathiona reduzido (GSH) no grupo irinotecano. Notavelmente, o tratamento com AS-605240 reverteu todos esses parâmetros.

A participação das PI3K γ na regulação da quimiotaxia de neutrófilos, seja por AS-605240 ou por deleção genética, levando a uma redução do estresse oxidativo, tem sido reportada em diversos estudos (Camps *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2021). Essa regulação, no entanto, pode variar dependendo do contexto e, em estudo *in vitro*, foi observada uma inibição incompleta, levantando à hipótese de que existe uma via independente de PI3K (SAI *et al.*, 2008).

No modelo de mucosite, observamos uma redução na migração dos neutrófilos pelo ensaio de MPO. Este efeito pode, dentre outros possíveis fatores, estar relacionado ao bloqueio

da sinalização dos receptores de quimiocinas acoplados à proteína G (GPCRs), que ocorre via a isoforma da classe 1B, PI3K γ , recrutando células inatas para locais de inflamação. Resumidamente, a subunidade $\beta\gamma$ da proteína G desempenha papel proeminente na migração de células via fosfatidilinositol 3-quinase γ (PI3K γ) e seu produto de fosforilação, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), atuando na amplificação da resposta em um ciclo de *feedback* positivo (GAMBARDELLA; VERMEREN, 2013; HIRSCH; MONTRUCCHIO; COSTA, 2006; SURVE *et al.*, 2016). Dessa forma, ao inibir a PI3K γ no modelo de mucosite por irinotecano, essa via de sinalização foi interrompida levando à redução do acúmulo local de neutrófilos, processo confirmado pela menor atividade da mieloperoxidase.

Além disso, estudos adicionais descrevem um paralelo entre PI3K γ e os níveis de H₂O₂ com a expressão de miRNA. Foi constatado que a inibição da PI3K α (pelo PIK75) e PI3K γ (pelo AS-605240), mas não PI3K β (pelo GSK2636771) ou PI3K δ (pelo IC-87114), reduz o miR-34a induzido por H₂O₂ em células epiteliais (BAKER *et al.*, 2016), demonstrando que a PI3K γ tem papel na ativação de EROS.

Outro ponto relevante que percebemos em nossos resultados remete à manutenção dos níveis de glutatona equivalente ao grupo veículo, ou seja, a inibição de PI3K γ reduz as espécies reativas de oxigênio, preservando os níveis de agentes antioxidantes celulares, não consumindo-os. Tal observação foi anteriormente descrita em ratos tratados com AS-605240 no modelo de Doença de Alzheimer esporádico induzido por estreptozotocina intracerebroventricular (ICV-STZ). Nesse estudo foi observado a prevenção da perda de GSH induzida por ICV-STZ de forma dose dependente (ALLURI *et al.*, 2020), corroborando com os resultados obtidos no modelo de mucosite por irinotecano e indicando o potencial efeito antioxidante do AS-605240.

Exploramos, ainda, alvos que participam da resposta Th1. Nesse ponto, foi observado diminuição do infiltrado de F4/80 e dos níveis de IL-1 β na vigência da inibição da PI3K γ . Curiosamente, apesar de AS-605240 reduzir parâmetros inflamatórios, percebemos o aumento do *Aim2* e dos transcritos de *Il18*. Parte desses resultados, inicialmente, se mostram conflitantes aos previamente descritos por nosso grupo que demonstraram a participação de IL-1 β , IL-18 e da caspase 1 no agravo da lesão intestinal por irinotecano (Lima-Júnior *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2016). Contudo, essa divergência é melhor compreendida quando consideramos relatos de redução dos níveis de caspase-1 clivada e de IL-1 β ao inibir da PI3K γ (TAVARES *et al.*, 2019). Dessa forma, nos indicam que mesmo diante do aumento da expressão de *Aim2*, que atua no reconhecimento do DNA citosólico de dupla fita (dsDNA) com consequente

ativação da cascata do inflamassoma (LIAN *et al.*, 2017; LOZANO-RUIZ; GONZÁLEZ-NAVAJAS, 2020), e dos transcritos de *Il18*, não há ativação dessa citocina pela caspase 1, ou seja, não ocorre sua conversão em citocina ativa. Essa observação em relação à *Il18* é corroborada pelos reduzidos níveis de IL-1 β . Coletivamente, reforça a participação da caspase 1 no agravo da mucosite intestinal no modelo por irinotecano e que a expressão desta ao ser reduzida pelo AS-605240 leva à atenuação dos danos intestinais.

Além disso, foi verificada a manutenção dos níveis de expressão de *Ifng* e *Il4* ao inibir PI3K γ . Esses resultados, contribuem, em parte, para a discussão de questões não totalmente esclarecidas relacionada a maturação, migração e ativação de células T no contexto da mucosite. Se por um lado há menção da manutenção da proliferação ou invasão dos linfócitos mediante a inibição de PI3K γ em modelo experimental de lúpus com posterior observação da redução de sobrevida nas células de memória CD4+ (BARBER *et al.*, 2006), por outro, há relatos de que a resposta migratória de células T humanas isoladas ocorre predominantemente pela PI3K γ (SMITH *et al.*, 2007). No entanto, nesse mesmo estudo, há ressalva de que essa migração depende do contexto e, em metodologia *ex vivo*, ocorreu manutenção da resposta de células T evoluindo para um mecanismo independente de PI3K.

Em conformidade com os nossos resultados, no modelo de artrite reumatoide a inibição PI3K γ não teve impacto na ativação de células T. Adicionalmente, nos ensaios *in vitro*, nesse mesmo estudo, foi percebido manutenção dos níveis de citocinas produzidas por células T incluindo TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-17 (GRUEN *et al.*, 2010). Já no modelo murino de colite induzida por Dextran Sulfato de Sódio (DSS) foi verificado redução de IFN- γ , mas, em concordância com nossos dados, os níveis de IL-4 foram aumentados. Além disso, foi descrito redução de AKT fosforilado e do infiltrado leucocitário (PENG *et al.*, 2010), reforçando, assim, a ideia de que o AS-605240 pode ser considerado um agente promissor no controle da inflamação intestinal.

Além do aumento de *Il4*, percebemos a manutenção dos transcritos de *Il33*, sugestivo de um perfil linfocitário Th2. Nesse ponto, é válido destacar o papel pleiotrópico da IL-33, atuando na resposta Th1, Treg, nas células Natural Killer, basófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas e de células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2s). Contudo, a presença de IL-33 associada a citocinas como IL-4, -5, -9 e -13 promove uma resposta Th2 caracterizada, principalmente, pela reparação tecidual e manutenção da barreira intestinal (CAYROL; GIRARD, 2022; HODZIC *et al.*, 2017).

A participação da IL-33 na mucosite intestinal já havia sido previamente descrita por nosso grupo, onde foi demonstrado que ao inibir a IL-33, seja por anticorpo anti-IL-33 ou pela proteína receptora solúvel ST2, verificou-se uma prevenção da mucosite e manutenção da atividade antitumoral do irinotecano sobre carcinoma de cólon CT26 (GUABIRABA *et al.*, 2014). Contudo, existem complexidades na função pleiotrópica da IL-33 que nos levam a algumas ponderações.

No nosso estudo, verificamos que no grupo irinotecano havia o aumento de *Il33*, sem, contudo, haver alteração dos níveis de *Il4*. Entretanto, ao inibir PI3K γ foi verificado o aumento da expressão de ambas citocinas nos levando a acreditar que o tratamento com o AS-605240 levou a um direcionamento para o perfil de resposta Th2.

No intestino, a função dessas citocinas convergem no sentido da proteção da barreira intestinal, com a IL-33 atuando como uma alarmina que promove uma resposta de diferenciação de células-tronco em linhagens de células intestinais secretoras (HODZIC *et al.*, 2017), enquanto a IL-4 induz o rápido transporte de mucina, aumentando a espessura e qualidade do muco intestinal no modelo de colite (SHARBA *et al.*, 2019b). Dessa forma, questionamos se o tratamento com AS-605240 levaria a um aumento da produção de mucinas no modelo de mucosite intestinal por irinotecano promovendo, assim, um efeito protetor na mucosa.

Para responder a esse questionamento, contabilizamos as células caliciformes presentes no íleo e, confirmamos a redução dessas células no grupo irinotecano, conforme previamente descrito na literatura. Em tais estudos, foi observado uma redução do número de células caliciformes e aumento de células cavitadas no colón no período de 24 a 72 horas. Essas cavitações indicam uma secreção acelerada de mucinas que foram correlacionadas positivamente à incidência de diarreia (STRINGER *et al.*, 2009; THORPE *et al.*, 2020).

Além da quantificação das células caliciformes, é relevante verificar o padrão de distribuição dessas células. Por isso, ao contabilizarmos tais células, diferenciamos entre o número de mucinas ácidas e neutras por coloração com Alcian Blue e PAS, respectivamente. Dessa forma, verificamos que a maior redução ocorreu para as mucinas neutras. Tal observação confirma o processo inflamatório em curso provocado pelo irinotecano, que pode estar envolvido com a redução da O-glicosilação pela MUC2, observado com frequência nas mucinas neutras, conforme descrito em estudo de colite ulcerativa que verificou redução de glicosilação quando a doença está ativa (LARSSON *et al.*, 2011; TRUTER *et al.*, 2017). Além disso, o

desbalanço no número de células caliciformes ácidas e neutras provocadas pelo irinotecano pode contribuir para alterações da microbiota estimuladas pela mudança de tamponamento (TRUTER *et al.*, 2017) podendo interferir no processo de metabolização do SN-38 pelas β -glucuronidases de bactérias.

Neste estudo, verificamos que o tratamento com AS-605240 resguardou a mucosa ao evitar a perda de células caliciformes e, conseqüente, evita que o dano se instale. Tal resposta poderia está relacionada à expressão concomitante de *Il4* e *Ifng*, que além de atuarem na qualidade e espessura do muco (SHARBA *et al.*, 2019b), também participam da função mitocondrial, com a IL-4 desempenhando um papel protetor (MAITI *et al.*, 2015).

Finalmente, constatamos que o tratamento com AS-605240 atenuou escores de diarreia. Dessa forma, além da participação da PI3K γ na resposta inflamatória intestinal já observada em modelos de colite por Dextran Sulfato de Sódio (DSS) (PENG *et al.*, 2010; VAN DOP *et al.*, 2010) e por Ácido Trinitrobenzeno Sulfônico (TNBS) (DUTRA *et al.*, 2011), acrescentamos evidências de forma inédita que ao controlar a resposta inflamatória, o inibidor AS-605240 também atenua os escores de diarreia em modelo de mucosite por irinotecano.

A relevância clínica do inibidor de PI3K γ no controle da toxicidade associado à quimioterapia foi verificada através de abordagens experimentais distintas que avaliaram a capacidade de controlar a toxicidade intestinal sem comprometer o efeito antineoplásico do irinotecano. Verificamos que o tratamento com AS-605240 não alterou a perda de massa corporal, nem o efeito mielotóxico do irinotecano, além de não interferir no peso de tumores excisados. Apesar de não ter sido observado o efeito sinérgico entre essas drogas, o efeito antiproliferativo do AS-605240 foi verificado através da redução do peso tumoral comparado ao grupo veículo.

Nesse sentido, é importante ressaltar que o tratamento oncológico, mesmo diante da constante evolução, ainda contribui para altos índices de morbidade por meio dos efeitos adversos. Dados apontam, ainda, que mais de 90% das mortes dos pacientes estão associados à resistência ao tratamento (SI *et al.*, 2019). Acredita-se que fatores como o efluxo de drogas, mudança de alvo, alterações nos pontos de verificação do ciclo celular, inibição da apoptose e aumento do reparo ao DNA contribuem para essa resistência (GOTTESMAN, 2002).

Uma forma de driblar esses mecanismos de resistência tumoral tem sido investigado fazendo uso de intervenções que combinem a quimioterapia ou imunoterapia associado a inibidores de vias de sinalização oncogênica como a via da PI3K/AKT/mTOR a fim de

promover efeito sinérgico (SUN; MENG, 2020). Mais precisamente ao que se refere a formação do microambiente tumoral, a ativação anormal da via da PI3K está associada ao fenótipo tumoral supressivo, diminuição da infiltração de células T CD8⁺ e regulação da angiogênese. Em conjunto, essa remodelação contribui para a redução da função citotóxica e aumento da imunossupressão associada a infiltração de macrófagos com fenótipo M2 e células T regulatórias no tumor (CASTEL *et al.*, 2021).

Dessa forma, a estratégica terapêutica de inibir PI3K por inibidores degenerados ou seletivos tem sido descrito como uma ferramenta de modulação no tratamento que visa a interface tumor/sistema imune. Apesar do impacto positivo dos pan-inibidores, é continuamente desenvolvido estratégias de inibição mais seletivas a fim de reduzir os efeitos tóxicos e, melhor caracterizar a função biológica da inibição exclusiva de determinada isoforma e sua atividade no microambiente tumoral. Por exemplo, foi descrito a redução preferencial de Células Treg em detrimento de células T CD8⁺ ao inibir PI3K δ (ALI *et al.*, 2014; LIM; OKKENHAUG, 2019) e, há relatos de imunoestimulação de macrófagos M1 e consequente ativação de T CD8⁺ favorecendo a atividade antitumoral quando a PI3K γ é inibida (DE HENAU *et al.*, 2016). Por conseguinte, no cenário que propõe a combinação de tratamentos visando a associação dos inibidores de PI3K foi relatado o aumento no tempo de sobrevida em ensaios pré-clínicos que propuseram a combinação do inibidor de δ/γ , TG100-115, associado à gencitabina em modelo de Adenocarcinoma ductal pancreático (KANEDA *et al.*, 2016) e, no estudo clínico que combinava IPI-549, inibidor seletivo de PI3K γ , com nivolumabe em tumores sólidos avançados foi citado uma ativação imunológica por meio da regulação positiva de IFN- γ e restauração de células T CD8⁺ nesses pacientes (SULLIVAN *et al.*, 2018; SUN; MENG, 2020).

No presente estudo confirmamos o efeito antiproliferativo ao inibir PI3K γ no modelo tumoral de células de câncer colorretal, contudo a combinação de tratamentos não apresentou efeito sinérgico. Dentre as possibilidades que eventualmente podem contribuir para esse resultado e, por consequência, requer maior investigação, remete a dose e ao esquema de tratamento que podem ser reavaliados a fim de obter a combinação de doses ideal para a promoção do efeito máximo da atividade antitumoral frente a combinação dessas drogas antiproliferativas.

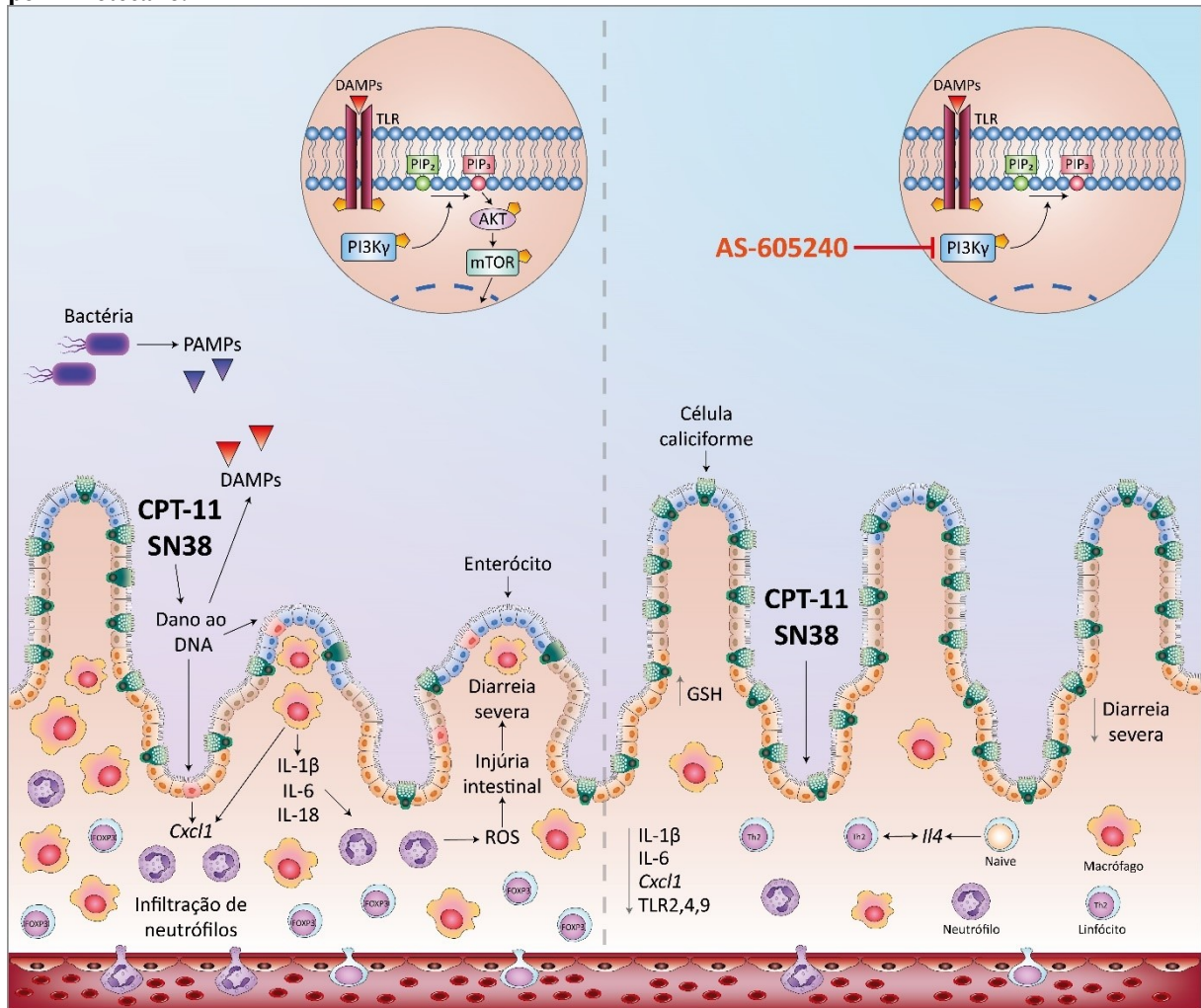
Por fim, ressaltamos, que a viabilidade da combinação de tratamento do irinotecano com inibidor de PI3K γ em estudos clínicos é uma perspectiva promissora. A recente aprovação dos inibidores de PI3K pela FDA em diferentes contextos, seja como bloqueadores de isoformas

isoladas, incluindo a isoforma p110 γ como IPI-549 em estágio de fase II (YU *et al.*, 2023), ou inibidores de múltiplas isoformas como o Duvelisib (inibidor dual de PI3K δ/γ) aprovado em 2018 (BLAIR, 2018; MENG *et al.*, 2021), tornam possíveis as investigações dessas combinações com outros agentes citotóxicos para o controle da mucosite. Dessa forma, a inibição de PI3K γ traria um ponto de equilíbrio entre a contenção da inflamação intestinal provocada pelo irinotecano, além de inviabilizar o crescimento tumoral em casos de resistência.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a inibição do PI3K γ atenua a mucosite intestinal associada à quimioterapia pelo aumento da expressão de citocinas de perfil de resposta Th2 (**Fig.19**) sem comprometer o efeito antitumoral do irinotecano. Portanto, os inibidores de PI3K γ podem ser uma estratégia terapêutica acessível para pacientes com câncer submetidos a regimes à base de irinotecano.

Figura 19: A inibição de PI3K γ pelo AS-605240 atenua o dano intestinal no modelo de mucosite induzido por irinotecano.



Fonte: Autora

O irinotecano (CPT11) e seu metabólito ativo SN-38 ao inibirem a topoisomerase I promovem a morte celular dos enterócitos e consequente liberação de DAMPs que ativam o sistema imunológico recrutando neutrófilos e macrófagos para a mucosa intestinal com consequente aumento de citocinas pró-inflamatórias, geração de espécies reativas de oxigênio e injúria intestinal gerando a um quadro de diarréia severa. Adicionalmente, a participação da via TLR/PI3K tem sido descrita no processo de agravamento do dano intestinal ao promover a amplificação da resposta inflamatória. Aqui, foi constatado a participação da isoforma PI3K γ na inflamação da mucosa no modelo de mucosite por irinotecano ao tratar camundongos com o inibidor AS-605240, seletivo para p110 γ , que promoveu a atenuação dos danos intestinais com redução da migração de neutrófilos e macrófagos, mudança do perfil de expressão de citocinas e direcionamento para uma resposta linfocitária Th2 que reverteu parcialmente a perda de células caliciformes. Além disso, houve preservação da arquitetura vilosa/críptas e redução dos escores de diarréia.

8 REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J. L.; WILSON, I. D.; TEARE, J.; MARCHESI, J. R.; NICHOLSON, J. K.; KINROSS, J. M. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology** **2017** **14**:6, v. 14, n. 6, p. 356–365, 8 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2017.20>>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- ALI, K.; SOOND, D. R.; PIÑEIRO, R.; HAGEMANN, T.; PEARCE, W.; LIM, E. L.; BOUABE, H.; SCUDAMORE, C. L.; HANCOX, T.; MAECKER, H.; FRIEDMAN, L.; TURNER, M.; OKKENHAUG, K.; VANHAESEBROECK, B. Inactivation of PI(3)K p110 δ breaks regulatory T-cell-mediated immune tolerance to cancer. **Nature** **2014** **510**:7505, v. 510, n. 7505, p. 407–411, 11 jun. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature13444>>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- ALLURI, R.; AMBATI, S. R.; ROUTHU, K.; KOPALLI, S. R.; KOPPULA, S. Phosphoinositide 3-kinase inhibitor AS605240 ameliorates streptozotocin-induced Alzheimer's disease like sporadic dementia in experimental rats. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 71, 2020. Disponível em: <<https://www.excli.com/articles/PMC7003642/>>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- ARGIRIS, A.; KUT, V.; LUONG, L.; AVRAM, M. J. Phase I and pharmacokinetic study of docetaxel, irinotecan, and celecoxib in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Investigational new drugs**, v. 24, n. 3, p. 203–212, maio 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16096702/>>. Acesso em: 24 jan. 2023.
- AZZI, J.; MOORE, R. F.; ELYAMAN, W.; MOUNAYAR, M.; EL HADDAD, N.; YANG, S.; JUREWICZ, M.; TAKAKURA, A.; PETRELLI, A.; FIORINA, P.; RUCKLE, T.; ABDI, R. The Novel Therapeutic Effect of Phosphoinositide 3-Kinase- γ Inhibitor AS605240 in Autoimmune Diabetes. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1509–1518, 1 jun. 2012. Disponível em: <<https://diabetesjournals.org/diabetes/article/61/6/1509/15350/The-Novel-Therapeutic-Effect-of-Phosphoinositide-3>>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- BAILLY, C. Irinotecan: 25 years of cancer treatment. **Pharmacological Research**, v. 148, p. 104398, 1 out. 2019.
- BAKER, J. R.; VUPPUSETTY, C.; COLLEY, T.; PAPAIOANNOU, A. I.; FENWICK, P.; DONNELLY, L.; ITO, K.; BARNES, P. J. Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via PI3K α reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells. **Scientific Reports** **2016** **6**:1, v. 6, n. 1, p. 1–13, 21 out. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep35871>>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- BALLESTRI, S.; YOSHIKAWA, S.; TANIGUCHI, K.; SAWAMURA, H.; IKEDA, Y.; ASAI, T.; TSUJI, A.; MATSUDA, S. Metabolic Associated Fatty Liver Disease as a Risk Factor for the Development of Central Nervous System Disorders. **Livers** **2023**, Vol. 3, Pages 21-32, v. 3, n. 1, p. 21–32, 5 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2673-4389/3/1/2/htm>>. Acesso em: 17 fev. 2023.
- BARBER, D. F.; BARTOLOMÉ, A.; HERNANDEZ, C.; FLORES, J. M.; FERNANDEZ-ARIAS, C.; RODRÍGUEZ-BORLADO, L.; HIRSCH, E.; WYMANN, M.; BALOMENOS, D.; CARRERA, A. C. Class IB-Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Deficiency Ameliorates IA-PI3K-Induced Systemic Lupus but Not T Cell Invasion. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 1, p. 589–593, 1 jan. 2006. Disponível em: <<https://journals.aai.org/jimmunol/article/176/1/589/75251/Class-IB-Phosphatidylinositol-3-Kinase-PI3K>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

- BARCELO, A.; CLAUSTRE, J.; MORO, F.; CHAYVIALLE, J. A.; CUBER, J. C.; PLAISANCIÉ, P. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut*, v. 46, n. 2, p. 218–224, 1 fev. 2000. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/content/46/2/218>>. Acesso em: 1 maio. 2023.
- BASILE, D.; DI NARDO, P.; CORVAJA, C.; GARATTINI, S. K.; PELIZZARI, G.; LISANTI, C.; BORTOT, L.; DA ROS, L.; BARTOLETTI, M.; BORGHI, M.; GERRATANA, L.; LOMBARDI, D.; PUGLISI, F. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. *Cancers* **2019**, Vol. 11, Page 857, v. 11, n. 6, p. 857, 20 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/11/6/857/htm>>. Acesso em: 16 jan. 2023.
- BILANGES, B.; POSOR, Y.; VANHAESEBROECK, B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2019** **20:9**, v. 20, n. 9, p. 515–534, 20 maio 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41580-019-0129-z>>. Acesso em: 2 maio. 2023.
- BLAIR, H. A. Duvelisib: First Global Approval. *Drugs*, v. 78, n. 17, p. 1847–1853, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-018-1013-4>>. Acesso em: 21 fev. 2023.
- BOWEN, J.; AL-DASOOQI, N.; BOSSI, P.; WARDILL, H.; VAN SEBILLE, Y.; AL-AZRI, A.; BATEMAN, E.; CORREA, M. E.; RABER-DURLACHER, J.; KANDWAL, A.; MAYO, B.; NAIR, R. G.; STRINGER, A.; TEN BOHMER, K.; THORPE, D.; LALLA, R. V.; SONIS, S.; CHENG, K.; ELAD, S. The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. *Supportive Care in Cancer* **2019** **27:10**, v. 27, n. 10, p. 4023–4033, 8 jul. 2019a. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00520-019-04893-z>>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; COLLER, J. K.; BLIJLEVENS, N.; BOSSI, P.; AL-DASOOQI, N.; BATEMAN, E. H.; CHIANG, K.; DE MOOIJ, C.; MAYO, B.; STRINGER, A. M.; TISSING, W.; WARDILL, H. R.; VAN SEBILLE, Y. Z. A.; RANNA, V.; VADDI, A.; KEEFE, D. M.; LALLA, R. V.; CHENG, K. K. F.; ELAD, S. Systematic review of agents for the management of cancer treatment-related gastrointestinal mucositis and clinical practice guidelines. *Supportive Care in Cancer*, v. 27, n. 10, p. 4011–4022, 1 out. 2019b. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00520-019-04892-0>>. Acesso em: 16 jan. 2023.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology*, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6276474/>>. Acesso em: 17 mar. 2023.
- CAMAYA, I.; DONNELLY, S.; O'BRIEN, B. Targeting the PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic β -cells to enhance their survival and function: An emerging therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Journal of Diabetes*, v. 14, n. 4, p. 247–260, 1 abr. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1753-0407.13252>>. Acesso em: 22 fev. 2023.
- CAMPS, M.; RÜCKLE, T.; JI, H.; ARDISSONE, V.; RINTELEN, F.; SHAW, J.; FERRANDI, C.; CHABERT, C.; GILLIERON, C.; FRANÇON, B.; MARTIN, T.; GRETENER, D.; PERRIN, D.; LEROY, D.; VITTE, P.-A.; HIRSCH, E.; WYMANN, M. P.; CIRILLO, R.; SCHWARZ, M. K.; ROMMEL, C. Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. 2005a. Disponível em:

<<http://www.nature.com/naturemedicine>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

CAMPS, M.; RÜCKLE, T.; JI, H.; ARDISSONE, V.; RINTELEN, F.; SHAW, J.; FERRANDI, C.; CHABERT, C.; GILLIERON, C.; FRANÇON, B.; MARTIN, T.; GREENER, D.; PERRIN, D.; LEROY, D.; VITTE, P. A.; HIRSCH, E.; WYMANN, M. P.; CIRILLO, R.; SCHWARZ, M. K.; ROMMEL, C. Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. **Nature Medicine** **2005** **11:9**, v. 11, n. 9, p. 936–943, 28 ago. 2005b. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm1284>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

CANCER INSTITUTE, N. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0. 2017. Disponível em: <<https://www.meddra.org/>>. Acesso em: 13 fev. 2023.

CASTEL, P.; TOSKA, E.; ENGELMAN, J. A.; SCALTRITI, M. The present and future of PI3K inhibitors for cancer therapy. **Nature cancer**, v. 2, n. 6, p. 587, 1 jun. 2021. Disponível em: <pmc/articles/PMC8809509/>. Acesso em: 22 jun. 2024.

CAYROL, C.; GIRARD, J. P. Interleukin-33 (IL-33): A critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine. **Cytokine**, v. 156, p. 155891, 1 ago. 2022.

CHAMSEDDINE, A. N.; DUCREUX, M.; ARMAND, J. P.; PAOLETTI, X.; SATAR, T.; PACI, A.; MIR, O. Intestinal bacterial β -glucuronidase as a possible predictive biomarker of irinotecan-induced diarrhea severity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 199, p. 1–15, 1 jul. 2019.

CHOG, Z. Z.; LI, F.; MAIESE, K. Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. **Histology and histopathology**, v. 20, n. 1, p. 299, jan. 2005. Disponível em: <pmc/articles/PMC2276698/>. Acesso em: 22 fev. 2023.

DAHLGREN, D.; SJÖBLOM, M.; HELLSTRÖM, P. M.; LENNERNÄS, H. Chemotherapeutics-Induced Intestinal Mucositis: Pathophysiology and Potential Treatment Strategies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 1020, 4 maio 2021.

DATASUS, 2024. **Painel-Oncologia - BRASIL**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/dhdat.exe?PAINEL_ONCO/PAINEL_ONCOLOGIABR.def>. Acesso em: 3 ago. 2024.

DE HENAU, O.; MERGHOUB, T.; WINKLER, D.; SHARMA, S.; PINK, M.; TCHAICHA, J.; RAUSCH, M.; PROCTOR, J.; KOSMIDER, N.; SOGLIA, J.; PALOMBELLA, V.; KUTOK, J. L.; WOLCHOK, J. D.; MCGOVERN, K. Abstract 554: Checkpoint blockade therapy is improved by altering the immune suppressive microenvironment with IPI-549, a potent and selective inhibitor of PI3K-gamma, in preclinical models. **Cancer Research**, v. 76, n. 14_Supplement, p. 554–554, 15 jul. 2016. Disponível em: <cancerres/article/76/14_Supplement/554/612411/Abstract-554-Checkpoint-blockade-therapy-is>. Acesso em: 22 jun. 2024.

DE MAN, F. M.; GOEY, A. K. L.; VAN SCHAİK, R. H. N.; MATHIJSEN, R. H. J.; BINS, S. Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. **Clinical Pharmacokinetics** **2018** **57:10**, v. 57, n. 10, p. 1229–1254, 8 mar. 2018. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s40262-018-0644-7>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

DI FEDE, O.; CANEPA, F.; MANISCALCO, L.; TOZZO, P.; MATRANGA, D.;

GIULIANA, G. Prevention and the treatment of oral mucositis: the efficacy of sodium bicarbonate vs other agents: a systematic review. **BMC Oral Health**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2023. Disponível em:

<<https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-022-02586-4>>. Acesso em: 30 maio. 2023.

DO CARMO, L. D.; DE FÁTIMA PINHEIRO RANGEL, G.; RABELO, L. M. A.; DE FÁTIMA GOEBEL DE SOUZA, T.; JÚNIOR, R. C. P. L.; WONG, D. V. T.; DE CARVALHO LEITÃO, R. F.; DA SILVA, A. A. V.; MAGALHÃES, P. J. C.; COSTA, A. S.; DE CARVALHO OLIVEIRA CAMPOS, D.; DE ALENCAR, N. M. N.; DE OLIVEIRA, H. D. Therapeutic effects of a lipid transfer protein isolated from *Morinda citrifolia* L. (noni) seeds on irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 395, n. 9, p. 1097–1107, 1 set. 2022. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-022-02267-7>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

DURRANT, T. N.; HERS, I. PI3K inhibitors in thrombosis and cardiovascular disease.

Clinical and Translational Medicine, v. 9, n. 1, p. e8, 1 jan. 2020. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1186/s40169-020-0261-6>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

DUTRA, R. C.; COLA, M.; LEITE, D. F. P.; BENTO, A. F.; CLAUDINO, R. F.; NASCIMENTO, A. F. Z.; LEAL, P. C.; CALIXTO, J. B. Inhibitor of PI3K γ ameliorates TNBS-induced colitis in mice by affecting the functional activity of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 2, p. 358, maio 2011.

Disponível em: </pmc/articles/PMC3087137/>. Acesso em: 20 fev. 2023.

ELAD, S.; CHENG, K. K. F.; LALLA, R. V.; YAROM, N.; HONG, C.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J.; GIBSON, R.; SAUNDERS, D. P.; ZADIK, Y.; ARIYAWARDANA, A.; CORREA, M. E.; RANNA, V.; BOSSI, P.; ARANY, P.; AL-AZRI, A. R.; BLIJLEVENS, N.; HOVAN, A.; FREGNANI, E.; FULTON, J.; GUEIROS, L. A.; ROULEAU, T.; COLLIER, J. K.; AL-DASOOQI, N.; WARDILL, H.; AMERINGER, S.; ANTUNES, H. S.; BATEMAN, E. H.; BEKTAS, K.; BENSADOUN, R. J.; TEN BOHMER, K.; BRITO-DELLAN, N.; CASTILLO, D.; CHIANG, K.; DE MOOIJ, C.; EILERS, J.; EPSTEIN, J.; GALITI, D.; FALL-DICKSON, J. M.; GOBBO, M.; ISSA HAZBOUN, H.; JENSEN, S. B.; JOHANSEN, J.; JOY, J.; JOY, K.; KANDWAL, A.; KATAOKA, T.; KEEFE, D.; LOPRINZI, C. L.; LUBART, R.; SKRIPNIK LUCAS, A.; MAJORANA, A.; MAYO, B.; DE MOOIJ, C.; MORI, T.; NAIR, R. G.; NASR, N.; NICOLATOU-GALITIS, O.; OTTAVIANI, G.; MIGLIORATI, C.; PENTENERO, M.; PORCELLO, L.; PETERSON, D.; POTTING, C.; RABER-DURLACHER, J.; VAN SEBILLE, Y. Z. A.; SOGA, Y.; SONIS, S.; STRINGER, A. M.; THORPE, D.; TILLY, V.; TISSING, W.; TORO, J. J.; TREISTER, N. S.; VADDI, A.; WEIKEL, D.; VAN DE WETERING, M.; ZUR, E. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 126, n. 19, p. 4423–4431, 1 out. 2020. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.33100>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

ELTING, L. S.; COOKSLEY, C.; CHAMBERS, M.; CANTOR, S. B.; MANZULLO, E.; RUBENSTEIN, E. B. The burdens of cancer therapy. **Cancer**, v. 98, n. 7, p. 1531–1539, 1 out. 2003. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.11671>>.

Acesso em: 17 jan. 2023.

ERVIN, S. M.; RAMANAN, S. V.; BHATT, A. P. Relationship Between the Gut Microbiome and Systemic Chemotherapy. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 65, n. 3, p. 874–884, 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-020->

06119-3>. Acesso em: 16 jan. 2023.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Onivyde lipossômico peguilado 1 (irinotecano) Anteriormente designado Onivyde**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.ema.europa.eu/contact>. Acesso em: 19 jan. 2023.

FERNANDES, C.; WANDERLEY, C. W. S.; SILVA, C. M. S.; MUNIZ, H. A.; TEIXEIRA, M. A.; SOUZA, N. R. P.; CÂNDIDO, A. G. F.; FALCÃO, R. B.; SOUZA, M. H. L. P.; ALMEIDA, P. R. C.; CÂMARA, L. M. C.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P. Role of regulatory T cells in irinotecan-induced intestinal mucositis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, p. 158–166, 30 mar. 2018.

FERREIRA, A. R. da S.; MÄRTSON, A. G.; DE BOER, A.; WARDILL, H. R.; ALFFENAAR, J. W.; HARMSSEN, H. J. M.; TISSING, W. J. E. Does Chemotherapy-Induced Gastrointestinal Mucositis Affect the Bioavailability and Efficacy of Anti-Infective Drugs? **Biomedicines** **2021**, Vol. **9**, Page **1389**, v. 9, n. 10, p. 1389, 4 out. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2227-9059/9/10/1389/htm>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

FRUMAN, D. A.; CHIU, H.; HOPKINS, B. D.; BAGRODIA, S.; CANTLEY, L. C.; ABRAHAM, R. T. The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605–635, 10 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28802037/>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

GAMBARDELLA, L.; VERMEREN, S. Molecular players in neutrophil chemotaxis—focus on PI3K and small GTPases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, n. 4, p. 603–612, 1 out. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.1112564>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

GELIBTER, A. J.; CAPONNETTO, S.; URBANO, F.; EMILIANI, A.; SCAGNOLI, S.; SIRGIOVANNI, G.; NAPOLI, V. M.; CORTESI, E. Adjuvant chemotherapy in resected colon cancer: When, how and how long? **Surgical Oncology**, v. 30, p. 100–107, 1 set. 2019.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. **Annual review of medicine**, v. 53, p. 615–627, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11818492/>>. Acesso em: 21 fev. 2023.

GRUEN, M.; ROSE, C.; KÖNIG, C.; GAJDA, M.; WETZKER, R.; BRÄUER, R. Loss of phosphoinositide 3-kinase decreases migration and activation of phagocytes but not T cell activation in antigen-induced arthritis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 7 abr. 2010. Disponível em: <<https://bmcmusculoskeletdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2474-11-63>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

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 Immunology** **2014** **7**:5, v. 7, n. 5, p. 1079–1093, 15 jan. 2014. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/mi2013124>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

HAWKINS, P. T.; STEPHENS, L. R. PI3K signalling in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 6, p. 882–897, 1 jun. 2015.

HIRSCH, E.; CIRAOLO, E.; GHIGO, A.; COSTA, C. Taming the PI3K team to hold

inflammation and cancer at bay. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 2, p. 192–205, 1 maio 2008.

HIRSCH, E.; MONTRUCCHIO, G.; COSTA, C. Signaling through P13K γ : A common platform for leukocyte, platelet and cardiovascular stress sensing Cardiac-related adverse effects of drugs View project Anti-inflammatory drug development for pulmonary pathologies View project. 2006. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/246712033>>. Acesso em: 3 maio. 2023.

HODZIC, Z.; SCHILL, E. M.; BOLOCK, A. M.; GOOD, M. IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. **Cytokine**, v. 100, p. 1–10, 1 dez. 2017.

HOLTHOF, L. C.; VAN DER HORST, H. J.; VAN HAL-VAN VEEN, S. E.; RUITER, R. W. J.; LI, F.; BUIJZE, M.; ANDERSEN, M. N.; YUAN, H.; DE BRUIJN, J.; VAN DE DONK, N. W. C. J.; LOKHORST, H. M.; ZWEEGMAN, S.; GROEN, R. W. J.; MUTIS, T. Preclinical evidence for an effective therapeutic activity of FL118, a novel survivin inhibitor, in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. **Haematologica**, v. 105, n. 2, p. e80–e83, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://haematologica.org/article/view/9546>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

JALIL, A. T.; HASSAN, N. F.; ABDULAMEER, S. J.; FARHAN, Z. M.; SULEIMAN, A. A. J.; AL-AZZAWI, A. K.; ZABIBAH, R.; FADHIL, A. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway and inflammatory bowel disease: Current status and future prospects. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/fcp.12894>>. Acesso em: 7 maio. 2023.

JIN, X.; CHU, Q.; SUN, L.; TRAN, M.; WANG, Y. Phosphoinositide 3 Kinase γ Plays a Critical Role in Acute Kidney Injury. **Cells**, v. 11, n. 5, 1 mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35269396/>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

JONES, J. A.; AVRITSCHER, E. B. C.; COOKSLEY, C. D.; MICHELET, M.; BEKELE, B. N.; ELTING, L. S. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. **Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer**, v. 14, n. 6, p. 505–515, 7 abr. 2006. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00520-006-0055-4>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

KANEDA, M. M.; CAPPELLO, P.; NGUYEN, A. V.; RALAINIRINA, N.; HARDAMON, C. R.; FOUBERT, P.; SCHMID, M. C.; SUN, P.; MOSE, E.; BOUVET, M.; LOWY, A. M.; VALASEK, M. A.; SASIK, R.; NOVELLI, F.; HIRSCH, E.; VARNER, J. A. Macrophage PI3K γ drives pancreatic ductal adenocarcinoma progression. **Cancer discovery**, v. 6, n. 8, p. 870, 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pmc/articles/PMC5091937/>>. Acesso em: 22 jun. 2024.

KCIUK, M.; MARCINIAK, B.; KONTEK, R. Irinotecan—Still an Important Player in Cancer Chemotherapy: A Comprehensive Overview. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 4919, v. 21, n. 14, p. 4919, 12 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/14/4919/htm>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

KEEFE. Gastrointestinal mucositis: A new biological model. **Supportive Care in Cancer**, v. 12, n. 1, p. 6–9, 5 jan. 2004. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00520-003-0550-9>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

KEEFE, D. M.; ELTING, L. S.; NGUYEN, H. T.; GRUNBERG, S. M.; APRILE, G.; BONAVENTURA, A.; SELVA-NAYAGAM, S.; BARSEVICK, A.; KOCZWARA, B.;

SONIS, S. T. Risk and outcomes of chemotherapy-induced diarrhea (CID) among patients with colorectal cancer receiving multi-cycle chemotherapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 675–680, 25 jul. 2014. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-014-2526-5>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

KHAGEH HOSSEINI, S.; KOLTERER, S.; STEINER, M.; VON MANSTEIN, V.; GERLACH, K.; TROJAN, J.; WAIDMANN, O.; ZEUZEM, S.; SCHULZE, J. O.; HAHN, S.; STEINHILBER, D.; GATTERDAM, V.; TAMPÉ, R.; BIONDI, R. M.; PROSCHAK, E.; ZÖRNIG, M. Camptothecin and its analog SN-38, the active metabolite of irinotecan, inhibit binding of the transcriptional regulator and oncoprotein FUBP1 to its DNA target sequence FUSE. **Biochemical pharmacology**, v. 146, p. 53–62, 15 dez. 2017. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29031818/>>. Acesso em: 21 jan. 2023.

KHAN, S.; WARDILL, H. R.; BOWEN, J. M. Role of toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated interleukin-6 (IL-6) production in chemotherapy-induced mucositis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 31–37, 1 jul. 2018. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-018-3605-9>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

KUDERER, N. M.; DESAI, A.; LUSTBERG, M. B.; LYMAN, G. H. Mitigating acute chemotherapy-associated adverse events in patients with cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology** 2022 19:11, v. 19, n. 11, p. 681–697, 11 out. 2022. Disponível em:

<<https://www.nature.com/articles/s41571-022-00685-3>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

KÜMLER, I.; BALSLEV, E.; STENVANG, J.; BRÜNNER, N.; EJLERTSEN, B.; JAKOBSEN, E. H.; NIELSEN, D. L. Two open-label, single arm, non-randomized phase II studies of irinotecan for the treatment of metastatic breast cancer in patients with increased copy number of the topoisomerase I gene. **BMC cancer**, v. 19, n. 1, 13 jun. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31196001/>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. **Modi@ed irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats.** [s.l: s.n.].

LALLA, R. V.; BRENNAN, M. T.; GORDON, S. M.; SONIS, S. T.; ROSENTHAL, D. I.; KEEFE, D. M. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and/or Head and Neck Radiation Therapy. **JNCI Monographs**, v. 2019, n. 53, 1 ago. 2019. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/jncimono/article/2019/53/lgz011/5551363>>. Acesso em: 18 jan. 2023.

LARSSON, J. M. H.; KARLSSON, H.; CRESPO, J. G.; JOHANSSON, M. E. V.; EKLUND, L.; SJÖVALL, H.; HANSSON, G. C. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 17, n. 11, p. 2299–2307, 1 nov. 2011. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/ibdjournal/article/17/11/2299/4630996>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

LEE, B.; MIN, J. A.; NASHED, A.; LEE, S. O.; YOO, J. C.; CHI, S. W.; YI, G. S. A novel mechanism of irinotecan targeting MDM2 and Bcl-xL. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 514, n. 2, p. 518–523, 25 jun. 2019.

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.; PORPO-RATO, 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**, v. 138, n. 7, p. 696–711, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29348263/>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

LIAN, Q.; XU, J.; YAN, S.; HUANG, M.; DING, H.; SUN, X.; BI, A.; DING, J.; SUN, B.; GENG, M. Chemotherapy-induced intestinal inflammatory responses are mediated by exosome secretion of double-strand DNA via AIM2 inflammasome activation. **Cell Research** **2017** **27**:6, v. 27, n. 6, p. 784–800, 14 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cr201754>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

LIM, E. L.; OKKENHAUG, K. Phosphoinositide 3-kinase δ is a regulatory T-cell target in cancer immunotherapy. **Immunology**, v. 157, n. 3, p. 210–218, 1 jul. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.13082>>. Acesso em: 22 jun. 2024.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; FIGUEIREDO, A. A.; FREITAS, H. C.; MELO, M. L. P.; WONG, D. V. T.; LEITE, C. A. V. G.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; VALE, M. L.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: Role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 931–942, 20 abr. 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-011-1780-z>>. Acesso em: 24 jan. 2023.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; FREITAS, H. C.; WONG, D. V. T.; WANDERLEY, C. W. S.; NUNES, L. G.; LEITE, L. L.; MIRANDA, S. P.; SOUZA, M. H. L. P.; BRITO, G. A. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 9, p. 2335–2350, 1 maio 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.12584>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

LIMA, B. H. F.; MARQUES, P. E.; GOMIDES, L. F.; MATTOS, M. S.; KRAEMER, L.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; LENNON, M.; HIRSCH, E.; RUSSO, R. C.; MENEZES, G. B.; HESSEL, E. M.; AMOUR, A.; TEIXEIRA, M. M. Converging TLR9 and PI3K γ signaling induces sterile inflammation and organ damage. **Scientific Reports** **2019** **9**:1, v. 9, n. 1, p. 1–15, 13 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-55504-0>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

LIU, C.; CHEN, K.; WANG, H.; ZHANG, Y.; DUAN, X.; XUE, Y.; HE, H.; HUANG, Y.; CHEN, Z.; REN, H.; WANG, H.; ZENG, C. Gastrin Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury by a PI3K/Akt/Bad-Mediated Anti-apoptosis Signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1672, 6 nov. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>>. Acesso em: 17 mar. 2023.

LOZANO-RUIZ, B.; GONZÁLEZ-NAVAJAS, J. M. The Emerging Relevance of AIM2 in Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences** **2020**, Vol. 21, Page 6535, v. 21, n. 18, p. 6535, 7 set. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/18/6535/htm>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

LUO, L.; WALL, A. A.; TONG, S. J.; HUNG, Y.; XIAO, Z.; TARIQUE, A. A.; SLY, P. D.;

FANTINO, E.; MARZOLO, M. P.; STOW, J. L. TLR Crosstalk Activates LRP1 to Recruit Rab8a and PI3K γ for Suppression of Inflammatory Responses. **Cell reports**, v. 24, n. 11, p. 3033–3044, 11 set. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30208326/>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

MACPHERSON, B.; DIGESTION, C. P.-; 1978, U. Experimental production of diffuse colitis in rats. **karger.com**, 1978. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/198104>>. Acesso em: 25 ago. 2022.

MAITI, A. K.; SHARBA, S.; NAVABI, N.; FORSMAN, H.; FERNANDEZ, H. R.; LINDEN, S. K. IL-4 Protects the Mitochondria Against TNF α and IFN γ Induced Insult During Clearance of Infection with *Citrobacter rodentium* and *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 5, 20 out. 2015. Disponível em: <[pmc/articles/PMC4613366/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27111111/)>. Acesso em: 30 abr. 2023.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 20 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.cell.com/article/S0092867417304130/fulltext>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

MELO, M. L. P.; BRITO, G. A. C.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B. L. M.; SILVA, J. V.; SOARES, P. M. G.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H. L. P.; 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 chemotherapy and pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 775–784, abr. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17624531/>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

MENG, D.; HE, W.; ZHANG, Y.; LIANG, Z.; ZHENG, J.; ZHANG, X.; ZHENG, X.; ZHAN, P.; CHEN, H.; LI, W.; CAI, L. Development of PI3K inhibitors: Advances in clinical trials and new strategies (Review). **Pharmacological Research**, v. 173, p. 105900, 1 nov. 2021.

MILANO, G.; INNOCENTI, F.; MINAMI, H. Liposomal irinotecan (Onivyde): Exemplifying the benefits of nanotherapeutic drugs. **Cancer science**, v. 113, n. 7, p. 2224–2231, 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35445479/>>. Acesso em: 21 jan. 2023.

MINDERMAN, H.; CONROY, J. M.; O'LOUGHLIN, K. L.; MCQUAID, D.; QUINN, P.; LI, S.; PENDYALA, L.; NOWAK, N. J.; BAER, M. R. In vitro and in vivo irinotecan-induced changes in expression profiles of cell cycle and apoptosis-associated genes in acute myeloid leukemia cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 6, p. 885–900, 1 jun. 2005. Disponível em: <<https://aacrjournals.org/mct/article/4/6/885/235559/In-vitro-and-in-vivo-irinotecan-induced-changes-in>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

NICOLATOU-GALITIS, O.; BOSSI, P.; ORLANDI, E.; RENÉ-JEAN BENSADOUN. The role of benzydamine in prevention and treatment of chemoradiotherapy-induced mucositis. **Supportive Care in Cancer**, v. 29, n. 10, p. 5701–5709, 1 out. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00520-021-06048-5>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

NOBRE, L. M. S.; DA SILVA LOPES, M. H.; GERAIX, J.; CAJADO, A. G.; SILVA, J. M. R.; RIBEIRO, L. R.; FREIRE, R. S.; CAVALCANTE, D. I. M.; WONG, D. V. T.; ALVES, A. P. N. N.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P. Paraprobiotic *Enterococcus faecalis* EC-12 prevents the development of irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Life Sciences**, v. 296, p. 120445, 1 maio 2022.

NÜRNBERG, B.; BEER-HAMMER, S. Function, Regulation and Biological Roles of PI3K γ Variants. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, 1 set. 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6770443/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3514181/)>. Acesso em: 18 maio. 2023.

O'DONNELL, J. S.; MASSI, D.; TENG, M. W. L.; MANDALA, M. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. **Seminars in Cancer Biology**, v. 48, p. 91–103, 1 fev. 2018.

OPAS. **Carga do Câncer - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/enlace/burden-cancer>>. Acesso em: 4 nov. 2022.

PAULÍK, A.; NEKVINDOVÁ, J.; FILIP, S. Irinotecan toxicity during treatment of metastatic colorectal cancer: focus on pharmacogenomics and personalized medicine. **Tumori**, v. 106, n. 2, p. 87–94, 1 abr. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30514181/>>. Acesso em: 22 jan. 2023.

PENG, X. D.; WU, X. H.; CHEN, L. J.; WANG, Z. L.; HU, X. H.; SONG, L. F.; HE, C. M.; LUO, Y. F.; CHEN, Z. Z.; JIN, K.; LIN, H. G.; LI, X. L.; WANG, Y. S.; WEI, Y. Q. Inhibition of Phosphoinositide 3-Kinase Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 1, p. 46–56, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://jpet.aspetjournals.org/content/332/1/46>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

PEREIRA, C. M. C.; JÚNIOR, G. J. D.; LIMA, J. V. D. N.; ALVES LEMOS, S. I.; DA ROCHA RODRIGUES, L.; DOS SANTOS FERREIRA, J.; ARAÚJO, A. S. M. L.; DE OLIVEIRA, J. C.; MONTEIRO, C. E.; FRANCO, Á. X.; PEREIRA ALVES, E. H.; OLIVEIRA SILVA, F. G.; DE CARVALHO FILGUEIRAS, M.; SOARES, P. M. G.; PEREIRA VASCONCELOS, D. F.; DE OLIVEIRA, J. S.; DE BRITO, T. V.; BARBOSA, A. L. R. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma participates in nimesulide-induced hepatic damage. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 73, n. 4, p. 496–504, 1 abr. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33793830/>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

PEREIRA, V. B. M.; MELO, A. T.; ASSIS-JÚNIOR, E. M.; WONG, D. V. T.; BRITO, G. A. C.; ALMEIDA, P. R. C.; RIBEIRO, R. A.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 323–332, 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-015-2938-x>>. Acesso em: 24 jan. 2023.

POMEL, V.; KLICIC, J.; COVINI, D.; CHURCH, D. D.; SHAW, J. P.; ROULIN, K.; BURGAT-CHARVILLON, F.; VALOGNES, D.; CAMPS, M.; CHABERT, C.; GILLIERON, C.; FRANÇON, B.; PERRIN, D.; LEROY, D.; GREENER, D.; NICHOLS, A.; VITTE, P. A.; CARBONI, S.; ROMMEL, C.; SCHWARZ, M. K.; RÜCKLE, T. Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 13, p. 3857–3871, 29 jun. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16789742/>>. Acesso em: 23 maio. 2023.

POMPURA, S. L.; DOMINGUEZ-VILLAR, M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 6, p. 1065–1076, 1 jun. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JLB.2MIR0817-349R>>. Acesso em: 27 maio. 2023.

RADWAN, R. R.; KARAM, H. M. Resveratrol attenuates intestinal injury in irradiated rats via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Environmental Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 223–230,

1 fev. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/tox.22859>>. Acesso em: 22 fev. 2023.

RANGEL, G. F. P.; RAMOS, M. V.; DO CARMO, L. D.; RABELO, L. M. A.; SILVA, A. A. V.; DE SOUSA, T. F. G.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; WONG, D. V. T.; LEITÃO, R. F. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; SOUSA, B. F.; FREDERICO, M. J. S.; ALENCAR, N. M. N. Successful Pre-Clinical Management of Irinotecan-Debilitated Animals: A Protein- Based Accessory Phytomedicine. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 3163–3171, 13 jun. 2022.

RATHINASWAMY, M. K.; BURKE, J. E. Class I phosphoinositide 3-kinase (PI3K) regulatory subunits and their roles in signaling and disease. **Advances in Biological Regulation**, v. 75, p. 100657, 1 jan. 2020.

RIBEIRO, R. A.; CARLOS, ·; WANDERLEY, W. S.; DEYSI, ·; WONG, V. T.; MAURÍCIO, J.; MOTA, S. C.; CAIO, ·; LEITE, A. V. G.; MARCELLUS, ·; SOUZA, H. L. P.; FERNANDO, ·; CUNHA, Q.; ROBERTO, ·; LIMA-JÚNIOR, C. P. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, p. 881–893, 2016.

ROMMEL, C.; CAMPS, M.; JI, H. PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 3, p. 191–201, mar. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17290298/>>. Acesso em: 7 maio. 2023.

RÜCKLE, T.; SCHWARZ, M. K.; ROMMEL, C. PI3K γ inhibition: towards an “aspirin of the 21st century”? **Nature Reviews Drug Discovery** 2006 5:11, v. 5, n. 11, p. 903–918, 13 out. 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrd2145>>. Acesso em: 16 fev. 2023.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C. J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, v. 115, n. 7, p. 1265–1275, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7582555/>>. Acesso em: 22 mar. 2023.

SAI, J.; RAMAN, D.; LIU, Y.; WIKSWO, J.; RICHMOND, A. Parallel phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-dependent and Src-dependent pathways lead to CXCL8-mediated Rac2 activation and chemotaxis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26538–26547, 26 set. 2008. Disponível em: <<http://www.jbc.org/article/S0021925820523983/fulltext>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

SALA, V.; SALA, A. Della; GHIGO, A.; HIRSCH, E. Roles of phosphatidyl inositol 3 kinase gamma (PI3K γ) in respiratory diseases. **Cell Stress**, v. 5, n. 4, p. 40, 1 abr. 2021.

SECOMBE, K. R.; CRAME, E. E.; TAM, J. S. Y.; WARDILL, H. R.; GIBSON, R. J.; COLLIER, J. K.; BOWEN, J. M. Intestinal toll-like receptor 4 knockout alters the functional capacity of the gut microbiome following irinotecan treatment. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 89, n. 2, p. 275–281, 1 fev. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-021-04382-3>>. Acesso em: 1 abr. 2023.

SHARBA, S.; NAVABI, N.; PADRA, M.; PERSSON, J. A.; QUINTANA-HAYASHI, M. P.; GUSTAFSSON, J. K.; SZEPONIK, L.; VENKATAKRISHNAN, V.; SJÖLING; NILSSON, S.; QUIDING-JÄRBRINK, M.; JOHANSSON, M. E. V.; LINDEN, S. K. Interleukin 4 induces rapid mucin transport, increases mucus thickness and quality and decreases colitis and

Citrobacter rodentium in contact with epithelial cells. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 97–117, 1 jan. 2019a. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21505594.2019.1573050>>. Acesso em: 30 abr. 2023.

SHARBA, S.; NAVABI, N.; PADRA, M.; PERSSON, J. A.; QUINTANA-HAYASHI, M. P.; GUSTAFSSON, J. K.; SZEPONIK, L.; VENKATAKRISHNAN, V.; SJÖLING; NILSSON, S.; QUIDING-JÄRBRINK, M.; JOHANSSON, M. E. V.; LINDEN, S. K. Interleukin 4 induces rapid mucin transport, increases mucus thickness and quality and decreases colitis and *Citrobacter rodentium* in contact with epithelial cells. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 97–117, 1 jan. 2019b. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/21505594.2019.1573050>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

SHIRASU, H.; TODAKA, A.; OMAE, K.; FUJII, H.; MIZUNO, N.; OZAKA, M.; UENO, H.; KOBAYASHI, S.; UESUGI, K.; KOBAYASHI, N.; HAYASHI, H.; SUDO, K.; OKANO, N.; HORITA, Y.; KAMEI, K.; YUKISAWA, S.; KOBAYASHI, M.; FUKUTOMI, A. Impact of UGT1A1 genetic polymorphism on toxicity in unresectable pancreatic cancer patients undergoing FOLFIRINOX. **Cancer Science**, v. 110, n. 2, p. 707–716, 1 fev. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cas.13883>>. Acesso em: 22 jan. 2023.

SHITARA, K.; MATSUO, K.; OZE, I.; MIZOTA, A.; KONDO, C.; NOMURA, M.; YOKOTA, T.; TAKAHARI, D.; URA, T.; MURO, K. Meta-analysis of neutropenia or leukopenia as a prognostic factor in patients with malignant disease undergoing chemotherapy. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 68, n. 2, p. 301–307, ago. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20960191/>>. Acesso em: 17 jan. 2023.

SI, W.; SHEN, J.; ZHENG, H.; FAN, W. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. **Clinical Epigenetics** 2019 11:1, v. 11, n. 1, p. 1–24, 11 fev. 2019. Disponível em:

<<https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-018-0587-8>>. Acesso em: 21 fev. 2023.

SILVA, J. A. G. da. **ESTIMATIVAS 2020 Incidência do Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]1–122 p.

SMITH, L. D.; HICKMAN, E. S.; PARRY, R. V.; WESTWICK, J.; WARD, S. G. PI3K γ is the dominant isoform involved in migratory responses of human T lymphocytes: effects of ex vivo maintenance and limitations of non-viral delivery of siRNA. **Cellular signalling**, v. 19, n. 12, p. 2528–2539, dez. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17900864/>>. Acesso em: 19 fev. 2023.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nature Reviews Cancer** 2004 4:4, v. 4, n. 4, p. 277–284, 2004. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrc1318>>. Acesso em: 16 jan. 2023.

SONIS, S. T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury. **Cancer**, v. 100, n. S9, p. 1995–2025, 1 maio 2004. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.20162>>. Acesso em: 16 jan. 2023.

- SONIS, S. T.; OSTER, G.; FUCHS, H.; BELLM, L.; BRADFORD, W. Z.; EDELSBERG, J.; HAYDEN, V.; EILERS, J.; EPSTEIN, J. B.; LEVEQUE, F. G.; MILLER, C.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M. M.; SPIJKERVET, F. K. L.; HOROWITZ, M. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 8, p. 2201–2205, 15 abr. 2001.
- SOUGIANNIS, A. T.; VANDERVEEN, B. N.; DAVIS, J. M.; FAN, D.; MURPHY, E. A. Understanding chemotherapy-induced intestinal mucositis and strategies to improve gut resilience. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 320, n. 5, p. G712, 5 maio 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8202195/>. Acesso em: 16 jan. 2023.
- STARK, A. K.; SRISKANTHARAJAH, S.; HESSEL, E. M.; OKKENHAUG, K. PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 23, p. 82–91, 1 ago. 2015.
- STEIN, A.; VOIGT, W.; JORDAN, K. Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, v. 2, n. 1, p. 51, 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC3126005/>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- STENVANG, J.; KÜMLER, I.; NYGÅRD, S. B.; SMITH, D. H.; NIELSEN, D.; BRÜNNER, N.; MOREIRA, J. M. A. Biomarker-guided repurposing of chemotherapeutic drugs for cancer therapy: A novel strategy in drug development. **Frontiers in Oncology**, v. 3 DEC, p. 313, 25 dez. 2013.
- STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, A. S. J.; LAURENCE, J.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan-induced mucositis is associated with changes in intestinal mucins. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 1, p. 123–132, 8 jun. 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-008-0855-y>. Acesso em: 30 abr. 2023.
- SULLIVAN, R. J.; HONG, D. S.; TOLCHER, A. W.; PATNAIK, A.; SHAPIRO, G.; CHMIELOWSKI, B.; RIBAS, A.; BRAIL, L. H.; ROBERTS, J.; LEE, L.; O’CONNELL, B.; KUTOK, J. L.; MAHABHASHYAM, S.; ULLMANN, C. D.; POSTOW, M. A.; WOLCHOK, J. D. Initial results from first-in-human study of IPI-549, a tumor macrophage-targeting agent, combined with nivolumab in advanced solid tumors. **https://doi.org/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.3013**, v. 36, n. 15_suppl, p. 3013–3013, 1 jun. 2018. Disponível em: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.3013>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- SUN, P.; MENG, L. hua. Emerging roles of class I PI3K inhibitors in modulating tumor microenvironment and immunity. **Acta Pharmacologica Sinica 2020 41:11**, v. 41, n. 11, p. 1395–1402, 16 set. 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41401-020-00500-8>. Acesso em: 22 jun. 2024.
- SUN, R.; ZHU, L.; LI, L.; SONG, W.; GONG, X.; QI, X.; WANG, Y.; GHOSE, R.; GAO, S.; HU, M.; LIU, Z. Irinotecan-mediated diarrhea is mainly correlated with intestinal exposure to SN-38: Critical role of gut Ugt. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 398, p. 115032, 1 jul. 2020.
- SURVE, C. R.; TO, J. Y.; MALIK, S.; KIM, M.; SMRCKA, A. V. Dynamic regulation of neutrophil polarity and migration by the heterotrimeric G protein subunits G α i-GTP and G β γ . **Science signaling**, v. 9, n. 416, p. ra22, 2 fev. 2016. Disponível em:

</pmc/articles/PMC6364554/>. Acesso em: 22 abr. 2023.

TAO, G.; HUANG, J.; MOORTHY, B.; WANG, C.; HU, M.; GAO, S.; GHOSE, R. Role of drug metabolizing enzymes in chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity and hepatotoxicity. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 16, n. 11, p. 1109, 1 nov. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC8059872/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

TAVARES, L. D.; GALVÃO, I.; COSTA, V. V.; BATISTA, N. V.; ROSSI, L. C. R.; BRITO, C. B.; REIS, A. C.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; BRAGA, A. D.; COELHO, F. M.; DIAS, A. C.; ZAMBONI, D. S.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M.; AMARAL, F. A.; SOUZA, D. G. Phosphoinositide-3 kinase gamma regulates caspase-1 activation and leukocyte recruitment in acute murine gout. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 619–629, 1 set. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JLB.MA1118-470RR>. Acesso em: 19 fev. 2023.

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 and Oncology Research**, v. 26, n. 2, p. 955–965, 1 abr. 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12253-019-00644-x>. Acesso em: 30 abr. 2023.

TRUTER, D.; STRIJDOM, H.; EVERSON, F.; KOTZÉ, S. H. Mucin secreting cells in the stomach and colon are altered by combination antiretroviral treatment in an obese rat model. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 2, p. 122–128, 1 mar. 2017.

VAN DOP, W. A.; MARENGO, S.; TE VELDE, A. A.; CIRAIOLO, E.; FRANCO, I.; TEN KATE, F. J.; BOECKXSTAENS, G. E.; HARDWICK, J. C.; HOMMES, D. W.; HIRSCH, E.; VAN DEN BRINK, G. R. The absence of functional PI3K γ prevents leukocyte recruitment and ameliorates DSS-induced colitis in mice. **Immunology Letters**, v. 131, n. 1, p. 33–39, 15 jun. 2010.

VANHAESEBROECK, B.; PERRY, M. W. D.; BROWN, J. R.; ANDRÉ, F.; OKKENHAUG, K. PI3K inhibitors are finally coming of age. **Nature Reviews Drug Discovery** 2021 20:10, v. 20, n. 10, p. 741–769, 14 jun. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41573-021-00209-1>. Acesso em: 7 maio. 2023.

VILLA, A.; VOLLEMANS, M.; DE MORAES, A.; SONIS, S. Concordance of the WHO, RTOG, and CTCAE v4.0 grading scales for the evaluation of oral mucositis associated with chemoradiation therapy for the treatment of oral and oropharyngeal cancers. **Supportive Care in Cancer**, v. 29, n. 10, p. 6061–6068, 1 out. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00520-021-06177-x>. Acesso em: 17 jan. 2023.

WEI, X.; HAN, J.; CHEN, Z. Z.; QI, B. W.; WANG, G. C.; MA, Y. H.; ZHENG, H.; LUO, Y. F.; WEI, Y. Q.; CHEN, L. J. A phosphoinositide 3-kinase- γ inhibitor, AS605240 prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 2, p. 311–317, 25 jun. 2010.

WONG, D. V. T.; HOLANDA, R. B. F.; CAJADO, A. G.; BANDEIRA, A. M.; PEREIRA, J. F. B.; AMORIM, J. O.; TORRES, C. S.; FERREIRA, L. M. M.; LOPES, M. H. S.; OLIVEIRA, R. T. G.; PEREIRA, A. F.; SANT'ANA, R. O.; ARRUDA, L. M. alverne; RIBEIRO-JÚNIOR, H. L.; PINHEIRO, R. F.; ALMEIDA, P. R. C.; CARVALHO, R. F.; CHAVES, F. F.; ROCHA-FILHO, D. R.; CUNHA, F. Q.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P. TLR4 deficiency upregulates TLR9 expression and enhances irinotecan-related intestinal mucositis and late-onset diarrhoea. **British Journal of Pharmacology**, v. 178, n. 20, p. 4193–4209, 1

out. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.15609>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

WONG, D. V. T.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; CARVALHO, C. B. M.; BORGES, V. F.; WANDERLEY, C. W. S.; BEM, A. X. C.; LEITE, C. A. V. G.; TEIXEIRA, M. A.; BATISTA, G. L. P.; SILVA, R. L.; CUNHA, T. M.; BRITO, G. A. C.; ALMEIDA, P. R. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ALEXOPOULOU, L. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS one**, v. 10, n. 10, 6 out. 2015a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26440613/>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

WONG, D. V. T.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; CARVALHO, C. B. M.; BORGES, V. F.; WANDERLEY, C. W. S.; BEM, A. X. C.; LEITE, C. A. V. G.; TEIXEIRA, M. A.; BATISTA, G. L. P.; SILVA, R. L.; CUNHA, T. M.; BRITO, G. A. C.; ALMEIDA, P. R. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ALEXOPOULOU, L. The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139985, 6 out. 2015b. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139985>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

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 Chemotherapy and Pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 287–298, 1 ago. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00280-019-03844-z>>. Acesso em: 17 ago. 2022.

WOO, W.; CAREY, E. T.; CHOI, M. Spotlight on liposomal irinotecan for metastatic pancreatic cancer: patient selection and perspectives. **OncoTargets and therapy**, v. 12, p. 1455–1463, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30863113/>>. Acesso em: 20 jan. 2023.

YU, M.; CHEN, J.; XU, Z.; YANG, B.; HE, Q.; LUO, P.; YAN, H.; YANG, X. Development and safety of PI3K inhibitors in cancer. **Archives of Toxicology** **2023**, v. 1, p. 1–16, 11 fev. 2023. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-023-03440-4>>. Acesso em: 21 fev. 2023.

YU, X.; XIA, Y.; ZENG, L.; ZHANG, X.; CHEN, L.; YAN, S.; ZHANG, R.; ZHAO, C.; ZENG, Z.; SHU, Y.; HUANG, S.; LEI, J.; YUAN, C.; ZHANG, L.; FENG, Y.; LIU, W.; HUANG, B.; ZHANG, B.; LUO, W.; WANG, X.; ZHANG, H.; HAYDON, R. C.; LUU, H. H.; HE, T. C.; GAN, H. A blockade of PI3K γ signaling effectively mitigates angiotensin II-induced renal injury and fibrosis in a mouse model. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30030497/>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

YUAN, X.; WU, H.; BU, H.; ZHOU, J.; ZHANG, H. Targeting the immunity protein kinases for immuno-oncology. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 163, p. 413–427, 1 fev. 2019.

YUE, B.; GAO, R.; WANG, Z.; DOU, W. Microbiota-Host-Irinotecan Axis: A New Insight Toward Irinotecan Chemotherapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 980, 14 out. 2021.

ZHANG, B.; DAI, Q.; JIN, X.; LIANG, D.; LI, X.; LU, H.; LIU, Y.; DING, J.; GAO, Q.; WEN, Y. Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B inhibition restores regulatory T cell's function in pulmonary sarcoidosis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 19911–19920, 1 nov. 2019. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.28589>>. Acesso em: 17 fev. 2023.

ZHU, J.; LI, K.; YU, L.; CHEN, Y.; CAI, Y.; JIN, J.; HOU, T. Targeting phosphatidylinositol 3-kinase gamma (PI3K γ): Discovery and development of its selective inhibitors. **Medicinal research reviews**, v. 41, n. 3, p. 1599–1621, 1 maio 2021. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33300614/>>. Acesso em: 17 maio. 2023.

ANEXO A- CERTIFICADO DE APROVAÇÃO PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL EMITIDO PELA CEUA



**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](#)

Linagem: [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, 30 de julho de 2019

Alexandre Havt Bindá

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

C. Roncari

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