

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Laila Sampaio Horta

ESTUDOS DE MECANISMOS IMUNOPATOBIOLÓGICOS DA MUCOSITE
EXPERIMENTAL

Belo Horizonte
2019

Laila Sampaio Horta

**ESTUDOS DE MECANISMOS IMUNOPATOBIOLÓGICOS DA MUCOSITE
EXPERIMENTAL**

Tese de doutorado apresentada pelo Programa
de Pós graduação em Bioquímica e Imunologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Helton da Costa Santiago
Coorientador Remo de Castro Russo

Belo Horizonte
2019

043

Horta, Laila Sampaio.

Estudos de mecanismos imunopatobiológicos da mucosite experimental [manuscrito] / Laila Sampaio Horta. – 2019.

95 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Helton da Costa Santiago. Co-orientador: Prof. Remo de Castro Russo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Mucosite. 3. Imunidade nas Mucosas. 4. Doxorrubicina. 5. Eosinófilos. I. Santiago, Helton da Costa. II. Russo, Remo de Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



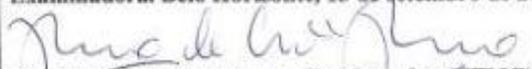
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 8627 - Pampulha
 31270-901 - Belo Horizonte - MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

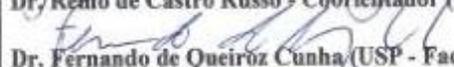


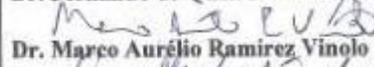
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE LAILA SAMPAIO HORTA. Aos treze dias do mês de setembro de 2019 às 13h30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Estudos de mecanismos imunopatobiológicos da mucosite experimental"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Remo de Castro Russo - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fernando de Queiroz Cunha (USP - Faculdade de Medicina - Ribeirão Preto), aprovada; Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo (Universidade Estadual de Campinas), aprovada; Dra. Danielle da Glória de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Leda Quercia Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

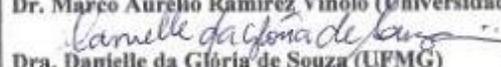
- APROVADA
 REPROVADA

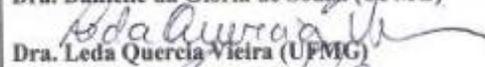
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 13 de setembro de 2019.

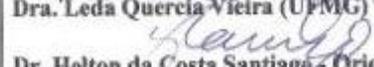

 Dr. Remo de Castro Russo - Coorientador (UFMG)


 Dr. Fernando de Queiroz Cunha (USP - Faculdade de Medicina - Ribeirão Preto)


 Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo (Universidade Estadual de Campinas)


 Dra. Danielle da Glória de Souza (UFMG)


 Dra. Leda Quercia Vieira (UFMG)


 Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)


 Prof. Mariana Marians Horta
 Sub-Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB/UFMG

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Apoio Financeiro: Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Dedico este trabalho às pessoas que foram fundamentais para mim durante esta árdua trajetória, me apoiando, me escutando e me ensinando sempre. Aos meus pais, Carlina e Áriston.

Agradecimentos

Aos meus pais pelo apoio incondicional durante toda minha vida pelas conversas que tanto me acalmavam e me ensinavam, por me mostrarem o mundo de uma outra perspectiva e confiarem em mim sempre. Amo muito vocês!

Aos meus queridos companheiros de laboratório: à Marcela pelo apoio nos momentos difíceis, pela imensa ajuda nos experimentos e por me ensinar com muito carinho a mexer no famigerado FlowJo, à Michele que sempre tem uma palavra amiga e disponibilidade de me ajudar nos longos experimentos que inventei durante esses anos, à Camila por sempre estar disposta a me ajudar e discutir resultados, à Sthefany pela alegria contagiante, apoio e carinho, ao Chico pela amizade e por me arrancar sorrisos nos dias mais difíceis, ao Gregs por aturar minhas reclamações e não se importar por eu sempre desligar o ar condicionado. Obrigada de coração, família IMPAR arrasa!!!

A professora Rosa Arantes pelas críticas duras que me fizeram crescer muito como pesquisadora e por me ensinar tanto sobre morfologia intestinal.

Ao professor Remo por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e abraçar o meu projeto, ajudando nos experimentos e nas discussões científicas.

Ao professor Helton pela oportunidade e confiança de desenvolver esse projeto no Laboratório de Imunoparasitologia, pelas discussões científicas sempre muito enriquecedoras, por abraçar todas as minhas idéias, pelos puxões de orelha tão necessários para minha formação e por todos os momentos fofos, que me davam força para continuar. Muitíssimo obrigada Professor!!!

Durante esses três anos e meio, só tenho agradecer a todos que passaram pelo meu camir´ que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me m ainda mais e os de sofrimento para um crescimento pessoal único. É muito difícil transfo. sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para realização e conclusão deste trabalho.

*“O começo de todas as ciências é o
espanto de as coisas serem o que
são”*

Aristóteles

Resumo

A fisiopatologia da mucosite, complicação comum em tratamento quimioterápico para o câncer, é pouco compreendida. O objetivo do presente trabalho foi elucidar mecanismos imunológicos associados a mucosite. Utilizamos um modelo de mucosite induzida por doxorubicina i.p. (Doxo, 10 mg/Kg) e realizamos curva ponderal e avaliações imunológicas, histopatológicas e de permeabilidade intestinal (DTPA-99mTc), 6 e 24 horas, 3, 5 e 7 dias depois da indução da mucosite (ddm). Ante a indução da mucosite, camundongos BALB/c apresentaram, entre 1 e 3 ddm, perda de peso, aumento de permeabilidade intestinal, encurtamento dos vilos intestinais com diminuição de profundidade de cripta e áreas de ulceração à histopatologia. Essas alterações foram acompanhadas de aumento de morte celular em células epiteliais (apoptose), células tronco (apoptose e necrose) e linfócitos (apoptose) com proliferação reativa em todas essas linhagens. Com três dias, observamos ainda um infiltrado inflamatório com forte componente de células Th2, ILC2, neutrófilos e eosinófilos. Coerentemente, a expressão de RNA para citocinas associadas a dano celular como TSLP e IL25, envolvidas na ativação de células Th2 e ILC2, aumentam com 6 horas após a indução da mucosite e apresentam variações ao longo dos dias. Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias de perfil tipo 2 diminuíram (IL4 e IL9) ou aumentaram (IL5) nos primeiros 3 dias de lesão quando comparadas ao grupo SHAM (injetado com PBS). Já citocinas associadas a regeneração tecidual (IL22) apresentaram aumento de expressão nas primeiras horas seguida de inibição no dia 3, movimento acompanhado por amphiregulina que também foi encontrada inibida no dia 3. Como a maioria dos demais parâmetros, a expressão de citocinas retornaram à normalidade no dia 7 após a indução da mucosite. Para verificar a relevância da resposta imune do tipo 2 na mucosite, induzimos mucosite em camundongos deficientes para ST2 (receptor de IL33, outra citocina importante para a diferenciação de ILC2 e Th2, mas que não apresentou expressão diferencial durante a mucosite quando comparada ao grupo controle). Apesar desses animais apresentarem melena, observamos apenas um pequeno atraso, não significativo estatisticamente, na recuperação da arquitetura intestinal no 7 ddm, bem como um atraso não significativo na resolução do aumento de permeabilidade intestinal

e evolução ponderal semelhante ao grupo de controles selvagens, sugerindo um papel discreto da IL33 na recuperação e integridade intestinal. Camundongos deficientes em eosinófilos (Δ dblGATA-1), por outro lado, não apresentaram perda de peso quando comparada ao seu controle selvagem com mucosite, sugerindo uma participação importante dessas células nos efeitos deletérios da mucosite. Como neutrófilo também apresentaram aumento durante a mucosite, realizamos a depleção de neutrófilos (usando anticorpo 1A8) ou a inibição da sua migração (usando DF 2162) e observamos que não houve alteração na evolução de peso, permeabilidade ou histopatologia, sugerindo participação secundária dessa célula na fisiopatologia da mucosite. Por outro lado, os camundongos deficientes para células T e B (RAG1 KO) possuem o mesmo perfil de mucosite que o tipo selvagem (WT), sugerindo que o sistema imune adaptativo não tem papel importante neste modelo. Em contra partida, camundongos deficientes para células T, B, NK e ILCs (NSG KO) mostraram alta suscetibilidade ao modelo de mucosite por doxorrubicina, com 100% de mortalidade. Quando realizamos a transferência adotiva de ILC2 para camundongos NSG KO observamos restauração da sobrevivência e dos parâmetros clínicos como os camundongos WT. Nossos dados sugerem que a resposta imune inata mediada por ILC2 promove a recuperação do intestino lesado durante o processo de mucosite enquanto que eosinófilos promovem patologia associada.

Palavras-chave: Mucosite, Doxorrubicina, ILC

Abstract

The pathophysiology of mucositis, a common complication in chemotherapy treatment for cancer, is poorly understood. The aim of this study was to elucidate immunological mechanisms associated with mucositis. We use a model of doxorubicin-induced mucositis i.p. (Doxo, 10 mg / kg and we performed weight curve and immunological, histopathological and intestinal permeability assessments (DTPA-99mTc), at 6 and 24 hours, 3, 5 and 7 days after mucositis induction (ddm). mucositis, BALB/c mice presented, between 1 and 3 ddm, weight loss, increased intestinal permeability, shortening of intestinal villi with decreased crypt depth, and areas of ulceration at histopathology. epithelial cells (apoptosis), stem cells (apoptosis and necrosis) and lymphocytes (apoptosis) with reactive proliferation in all these strains. Three days later we observed an inflammatory infiltrate with strong Th2, ILC2, neutrophil and eosinophil cells. RNA expression for cell damage-associated cytokines such as TSLP and IL25 involved in Th2 and ILC2 cell activation increase 6 hours after mucositis induction and show variations over the days. On the other hand, proinflammatory cytokines of type 2 profile decreased (IL4 and IL9) or increased (IL5) in the first 3 days of injury when compared to the SHAM group (injected with PBS). Tissue regeneration-associated cytokines (IL22) showed increased expression in the first hours followed by inhibition on day 3, movement accompanied by amphiregulin that was also found inhibited on day

3. Like most other parameters, cytokine expression returned to normal within the first few hours. day 7 after mucositis induction. To verify the relevance of the type 2 immune response in mucositis, we induced mucositis in ST2-deficient mice (IL33 receptor, another important cytokine for ILC2 and Th2 differentiation, but which did not show differential expression during mucositis compared to the control group).). Although these animals present melena, we observed only a small, non-statistically significant delay in the recovery of intestinal architecture at 7 ddm, as well as a non-significant delay in the resolution of intestinal permeability increase and weight evolution similar to the group of wild controls, suggesting a significant role. IL33 in the recovery and intestinal integrity. Eosinophil-deficient mice (Δ dblGATA-1), on the other hand, did not show weight loss when compared to their wild control with mucositis, suggesting an important participation of these cells in the deleterious effects of mucositis. As neutrophils also increased during mucositis, we performed neutrophil depletion (using antibody 1A8) or inhibited their migration (using DF 2162) and observed that there was

no change in weight evolution, permeability or histopathology, suggesting secondary involvement of this cell in pathophysiology of mucositis. On the other hand, T and B cell deficient mice (RAG1 KO) have the same mucositis profile as wild type (WT) mice, suggesting that the adaptive immune system plays no important role in this model. In contrast, mice deficient in T, B, NK and ILC cells (NSG KO) showed high susceptibility to the doxorubicin mucositis model, with 100% mortality. When we performed the adoptive transfer of ILC2 to NSG KO mice we observed restoration of survival and clinical parameters like WT mice. Our data suggest that the innate ILC2-mediated immune response promotes recovery of the injured bowel during the mucositis process while eosinophils promote associated pathology.

Key-words: Mucositis, Doxorubicin, ILC

Lista de figuras

Figura 1: A barreira epitelial do intestino.....	17
Figura 2: As subpopulações de ILCs.....	20
Figura 3: Desenvolvimento da mucosite	24
Figura 4: Estrutura molecular das antraciclina utilizadas na clínica.....	25
Figura 5: Representação da farmacodinâmica da Doxorubicina.....	27
Figura 6: Estratégia de gate painel de Imunidade Inata.....	35
Figura 7: Estratégia de gate painel Células Linfoides Inatas.....	38
Figura 8: Estratégia de gate painel Linfócitos T.....	39
Figura 9: Estratégia de gate painel Morte celular.....	41
Figura 10: Estratégia de gate painel Morte celular.....	43
Figura 11: : Mucosite experimental em camundongos BALB/c. (A) Variação de peso dos animais durante os 7 dias de acompanhamento	51
Figura 12: Perfil de morte celular e proliferação das células da camada epitelial intestinal durante a mucosite.....	53
Figura 13: : Perfil de células imunes inatas da lâmina própria no decorrer da mucosite.....	55
Figura 14: : Expressão de citocinas no decorrer da mucosite.....	57
Figura 15: Mucosite experimental em camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com DF2162.	59
Figura 16: : Mucosite experimental em camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com 1A8.....	61
Figura 17: : Alterações clínicas, histológicas e de citocinas em camundongos GATA1 KO durante a mucosite.....	63

Figura 18: Alterações clínicas, histológicas e de citocinas em camundongos ST2 KO durante a mucosite.....	65
Figura 19: Alterações clínicas, histológicas e de citocinas em camundongos RAG1 KO durante a mucosite	66
Figura 20: Alterações clínicas e histológicas em camundongos NSG KO durante a mucosite	68
Figura 21: Alterações clínicas e histológicas em camundongos NSG KO com transferência adotiva de ILC2	70
Figura 22: Perfil de células imunes inatas em PBMCs de pacientes no decorrer da mucosite	71

Lista de tabela

Tabela 1: Datas da aprovação do uso de Daunomicina e Adriamicina.....	26
Tabela 2: Anticorpos utilizados no painel de Imunidade Inata.....	34
Tabela 3: Anticorpos utilizados no painel de Células Linfoides Inatas e Linfócitos T.....	36
Tabela 4: Anticorpos utilizados no painel de Necrose e Apoptose.....	40
Tabela 5: Anticorpos utilizados no painel de Proliferação.....	42
Tabela 6: Anticorpos utilizados no painel de Sorting.....	44
Tabela 7: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR.....	43

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	<i>A mucosa intestinal</i>	20
1.1	<i>Mucosite</i>	26
1.2	<i>Doxorrubicina</i>	30
2	OBJETIVOS	34
2.1	<i>Objetivo geral</i>	34
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	<i>Animais</i>	35
3.2	<i>Delineamento Experimental</i>	35
3.3	<i>Eutanásia</i>	36
3.4	<i>Análise histológica</i>	36
3.5	<i>Leucócitos da lâmina própria</i>	36
3.6	<i>Citometria de Fluxo</i>	37
3.6.1	<i>Painel Imunidade Inata</i>	38
3.6.2	<i>Painel Células Linfoides Inatas e Linfócitos T</i>	41
3.6.3	<i>Painel Necrose e Apoptose</i>	44
3.6.4	<i>Painel Proliferação</i>	48
3.6.5	<i>Painel Sorting</i>	51
3.7	<i>Análise da expressão gênica</i>	52
3.7.1	<i>Extração de RNA</i>	52
3.7.2	<i>Síntese de cDNA</i>	53
3.8	<i>Teste de permeabilidade intestinal</i>	55
3.9	<i>Análise estatística</i>	55
4	RESULTADOS	56
4.1	<i>O tratamento com Doxorrubicina causa perda de peso, aumento da permeabilidade intestinal e induz alterações na arquitetura do intestino com ulcerações compatíveis com mucosite</i>	56
4.2	<i>O tratamento com Doxorrubicina induz morte das células presentes na monocamada epitelial do intestino e interfere na taxa proliferativa</i>	59
4.3	<i>A mucosite altera o perfil de células da lâmina própria para uma inflamação do tipo 2</i>	60
4.3	<i>A Doxorrubicina induz expressão de citocinas do tipo 2</i>	62
4.4	<i>Neutrófilos tem papel secundário no desenvolvimento da mucosite</i>	63
4.5	<i>Camundongos deficientes em eosinófilos são protegidos da mucosite induzida por Doxorrubicina</i>	66
4.6	<i>Camundongos ST2 KO apresentam perfil da mucosite semelhante ao WT</i>	67
4.7	<i>Camundongos deficientes em linfócitos T e B apresentam perfil da mucosite semelhante ao WT</i>	69
4.8	<i>Linfócitos inatos (ILC) são fundamentais para a sobrevivência a mucosite experimental</i>	70
4.9	<i>Transferência adotiva de ILC2 para camundongos NSG KO diminui taxa de mortalidade e mantém monocamada epitelial do intestino</i>	71
4.10	<i>Pacientes que desenvolvem mucosite tem alteração nas populações de eosinófilos e ILCs</i>	73
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÃO	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 Introdução

1.1 A mucosa intestinal

O trato gastrointestinal (TGI) tem uma duplicidade de papéis na fisiologia animal atuando na digestão e captação de nutrientes e na manutenção da homeostase imune intestinal. O TGI, por sua vez, é o maior sítio de integração do organismo com o meio externo. A mucosa do intestino delgado humano é estimada em 300 m² (Moog, 1981). Associado a essa mucosa, existe um tecido linfóide também muito extenso conhecido como tecido linfóide associado ao intestino ou GALT (do inglês Gut-associated lymphoid tissue) (Bott, 2014).

A especialização gastrointestinal deve-se a uma potente pressão evolutiva: onde e como os animais viviam. Mudanças na estrutura e função do trato gastrointestinal permitiram maior diversidade alimentar e absorção de nutrientes. Além de importante papel para digestão de alimentos e absorção de água, o intestino também entra em contato com uma diversidade de antígenos alimentares e microbiota, bem como abriga o sistema imune (Bott, 2014).

Uma das principais forças que tem impulsionado o desenvolvimento e estimulação de todo o sistema imune durante sua ontogenia e evolução, e continua a fazê-lo em todos os dias de vida, é a interface das mucosas com o ambiente externo que compreende a complexa microbiota associada à mucosa, os antígenos dos alimentos, o ar inalado, os xenobióticos ambientais e os potenciais agentes patogênicos e seus produtos. A pressão seletiva desses antígenos ambientais resultou na distribuição estratégica, por toda a mucosa, de células envolvidas na absorção, processamento e apresentação de antígenos e na produção de fatores humorais e celulares da imunidade inata e específica (Ley, Peterson and Gordon, 2006).

A avaliação quantitativa dos macrófagos, células dendríticas (DC), linfócitos T e B, células linfóides inatas (ILC) e outras linhagens celulares no sistema imune das mucosas, revela número superior das mesmas na lâmina própria, bem como a sua diversidade fenotípica e heterogeneidade funcional. Essas células trabalham em conjunto de modo a entrar em harmonia com os antígenos ambientais sem comprometer a integridade da barreira da mucosa, evitando a hiperestimulação do sistema imune. Esse

objetivo é alcançado pelas interações entre células do sistema imune e células epiteliais, fenotipicamente e funcionalmente diferentes, que cobrem as enormes áreas de superfície das membranas mucosas (Bott 2014; Ley et al. 2006).

As funções de absorção e proteção do intestino dependem de um epitélio intestinal intacto e funcional. A homeostase do epitélio intestinal adulto normal é mantida por substituição contínua e rápida de células epiteliais especializadas através de diferenciação e posterior migração de stem cells, que se dá a cada 4-5 dias (Forchielli and Walker, 2005; Kosiewicz, Zirnheld and Alard, 2011). As stem cells se localizam na base da cripta, entre células de Paneth, ou na posição +4 (acima da porção onde as células de Paneth se encontram) (Umar, 2010; Peterson and Artis, 2014).

As células-tronco do intestino dão origem aos enterócitos (células absorptivas), às células caliciformes (células produtoras de muco), às células enteroendócrinas (células produtoras de hormônios) e às células de Paneth (células que secretam substâncias antimicrobianas). Novas células são formadas nas criptas e migram para porção distal dos vilos. Aproximadamente três dias após a sua diferenciação terminal, as células epiteliais atingem a ponta das vilosidades, ficam viáveis por alguns dias, sofrem apoptose espontânea e são vertidas para dentro do lúmen do intestino.

As células de Paneth são o único tipo celular epitelial intestinal que tem migração diferenciada, uma vez que se localizam nas criptas. (van der Flier and Clevers, 2009; Clevers, 2013). Tais células são exclusivamente adaptadas para a secreção de proteínas antimicrobianas (PAMs), incluindo defensinas (criptidinas em camundongo), catelicidinas e lisozima, nas criptas do intestino delgado. Essa estratégia permite a ampla regulação do número de bactérias patogênicas e comensais no intestino (Peterson and Artis, 2014). As células caliciformes produzem o muco, que é composto de mucinas glicosiladas. A alta secreção de mucinas glicosiladas no lúmen intestinal por essas células é a primeira barreira de defesa contra invasão bacteriana. A mucina mais abundante é a mucina 2 (MUC2), fundamental para organização das camadas de muco no cólon. A importância da produção de MUC2 pelas células caliciformes pode ser demonstrada pelo desenvolvimento espontâneo de câncer colorretal induzido por inflamação em camundongos deficientes em MUC2 (Velcich, 2002; Van der Sluis et al., 2006).

Produtos derivados de células caliciformes, tais como fator trefoil 3 (TFF3) e molécula β tipo resistina (RELM β), contribuem para a regulação da barreira física no intestino.

As TFF3 proporcionam integridade estrutural ao muco, ligando-se a mucina, e atuam como um sinal que promove a reparação epitelial, a migração de IECs e a resistência à apoptose. O RELM β promove a secreção de MUC2, atua no processo de regulação de macrófagos e nas respostas de células T durante a inflamação (Taupin, Kinoshita and Podolsky, 2000).

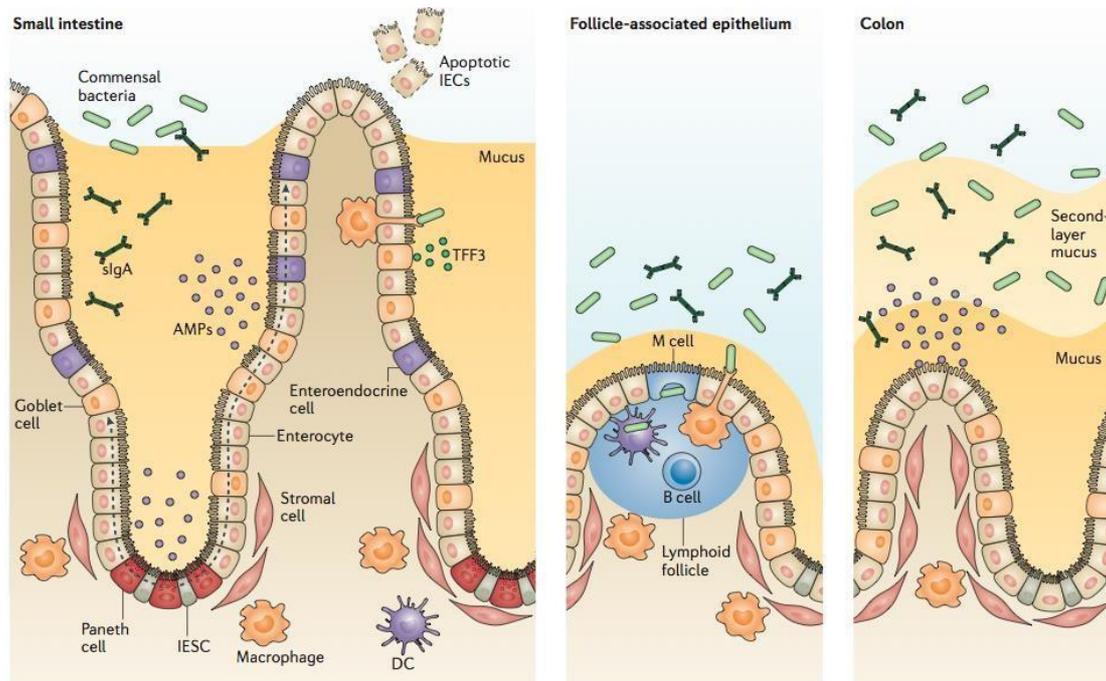


Figura 1: A barreira epitelial do intestino. Células epiteliais intestinais (IECs) formam uma barreira física e bioquímica que mantém a segregação entre a microbiota luminal e o sistema imune da mucosa. O nicho de células tronco epiteliais do intestino, células estromais e hemaopoiéticas, controla a renovação contínua da camada de células epiteliais por células estaminais cripta - residente. IECs diferenciadas - com exceção das células de Paneth - migram para cima do eixo cripta-vilo, como indicado pelas setas tracejadas. Células caliciformes e células de Paneth secretam muco e proteínas antimicrobianas (AMPs), respectivamente, para promover a exclusão de bactérias da superfície epitelial. Contribuindo para esta função da barreira, há liberação luminal e por transcitose de IgA secretória (sIgA). Células M e células caliciformes mediam o transporte de antígenos luminiais e bactérias vivas através da barreira epitelial para as células dendríticas (DC), através de dendritos transepiteliais, e macrófagos residentes provar o lúmen. TFF3, factor trefoil 3. (Modificado de: Peterson & Artis 2014)

Como dito anteriormente, a mucosa intestinal lida com uma grande quantidade de antígenos, microorganismos e outros estímulos externos e precisa fazê-lo de forma balanceada para não permitir o avanço de infecções ou a hiperestimulação do sistema imune. Para isso, a mucosa intestinal abriga o maior tecido linfóide do organismo, sendo que 70% dos linfócitos ali presentes estão ativados. Esse tecido linfóide é conhecido como GALT (do inglês Gut-associated lymphoid tissue). Uma grande quantidade desses

linfócitos está localizada nas placas de Peyer (PP) e na lâmina própria intestinal (linfócitos da lâmina própria), assim como nos linfonodos mesentéricos (LNM) e muitas dessas células expressam moléculas de ativação e secretam citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-4, IL-13 e TNF- α (Forchielli and Walker, 2005; Bott, 2014). Por outro lado, um dos aspectos mais interessantes das interações diárias entre os antígenos da microbiota e da dieta com os elementos linfóides da mucosa intestinal, é que esse estado de ativação não se traduz em um quadro de inflamação patológica. Ao contrário, esses contatos com antígenos no intestino induzem dois tipos de atividades imunológicas não inflamatórias: a produção de IgA secretória (SIgA) e a indução de tolerância oral (Faria & Weiner, 1999).

A tolerância oral é um evento análogo à tolerância aos auto-componentes mas ocorrendo no intestino e dirigida a antígenos externos. Conceitualmente, a tolerância oral se refere a uma supressão ativa da reatividade imunológica ao antígeno que tenha sido contactado primeiramente pela via oral (Carvalho, Verdolin and Vaz, 1997). Ela é um evento imunológico único uma vez que este processo envolve a assimilação contínua de antígenos exógenos. Assim, as proteínas da dieta e a microbiota comensal que entram em contato diário com a mucosa, representam a fronteira entre o externo e os componentes próprios. Então, a tolerância oral é uma forma de tolerância periférica que envolve o reconhecimento dos antígenos externos que acessam o corpo pela via oral como componentes internos, que por sua vez, tornam-se parte do próprio (Faria, Ana M C; Weiner, 1999; Weiner, 2011).

As células linfóides inatas (ILCs) são uma nova população de células imunes com importantes funções efetoras da imunidade inata, além de desempenharem papel fundamental na remodelação tecidual e organização dos tecidos linfóides periféricos. As ILCs são definidas por três características principais: a ausência de genes ativadores de recombinação (RAG), portanto não apresentam TCR ou BCR; ausência de marcadores fenotípicos de células mielóides e dendríticas; e sua morfologia linfóide (Artis and Spits, 2015; Shikhagaie et al., 2017). Em 1975, Kiessling e colaboradores publicaram, pela primeira vez, um estudo demonstrando uma nova subpopulação de células imunes encontradas em baço de camundongos com morfologia semelhante a linfócitos. Entretanto, utilizando o método de separação por coluna, identificaram não se tratar de células T ou B, mas apresentavam função citotóxica expressiva. Esta população foi identificada como Natural Killers cells ou NKs (Kiessling et al., 1975).

Scollay (1992) observando o acúmulo de células em linfonodos nos primeiros sete dias de vida, descreveram uma migração massiva de células CD3-CD4⁺CD8⁻Thy1 (Scollay

and Walter, 1992). Cinco anos mais tarde, 1997, Weissman e colaboradores, investigando a formação de linfonodos no período neonatal, propuseram que um novo tipo celular (CD3- LT β + α 4 β 7+) era responsável pela organização dos linfonodos. Estas células se tratavam das encontradas por Kelly e Scollay e foram denominadas Lymphoid Tissue inducer ou LTi (Mebius, Rennert and Weissman, 1997).

Posteriormente a estes trabalhos, pesquisadores de todo o mundo decidiram se dedicar a entender melhor sobre estes linfócitos que não apresentavam a maioria dos cluster de diferenciação conhecidos a época. Apenas em 2013, especialistas da área, em um trabalho de revisão, descreveram a nomenclatura de consenso como: Innate Lymphoid Cells ou ILCs. (Spits et al., 2013)

Dentro das ILCs encontramos 3 subpopulações diferentes: ILC1(Tbet+), das quais pertencem às NKs, ILC2 (GATA3+) e ILC3 (ROR γ t+). Cada um destes subtipos corresponde, no sistema imune inato, às respostas do tipo Th1, Th2 e Th17, respectivamente. A ativação e proliferação das ILCs foi descrita como dependente de sinalização via CD127, receptor da IL-7 α (Gasteiger et al., 2015; Almeida and Belz, 2016; Vivier et al., 2016). Entretanto, alguns trabalhos demonstram que também podem utilizar-se do eixo CD25/IL-2 para tais funções (Engelbertsen, 2015). Recentemente, em 2017, foi descrito uma ILCreg, capaz de produzir IL-10. Apesar de não expressar FoxP3, possui outro fator de transcrição atuante: Id2. (Wang et al., 2017)

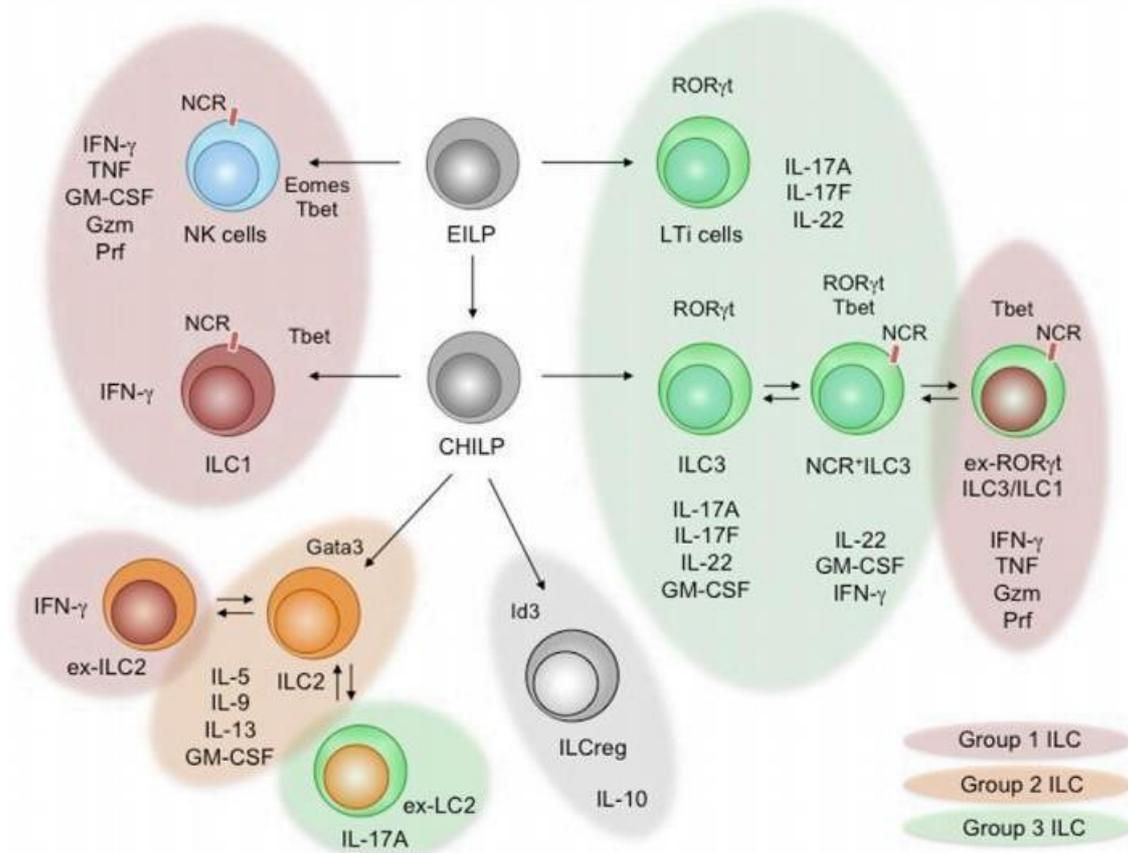


Figura 2: As subpopulações de ILCs. As células hematopoiéticas precursoras das Innate Lymphoid cells (ILCs) são ID2+. O commitment para as subpopulações se dá mediante a expressão de fatores de transcrição específicos. As ILCs do grupo 1 expressão T-bet, ILC1 apenas T-bet e NKs T-bet e EOMES. As do grupo 2 expressam GATA3. Foi descrito que há uma interconversão de ILCs de outros grupos, como ILC2 em ILC1, bem como ILC2 em ILC3, ambos processos podem ocorrer de maneira reversa. Recentemente, uma nova classe foi descrita, as ILCreg, estas expressam Id3 e secretam IL-10, atuando como uma Treg. O grupo 3 é definido pela expressão de ROR γ t, abrange as LTi, e ILC3. Dentre as ILC3 temos as que expressam apenas ROR γ t e as que expressam ROR γ t e T-bet. Também pode ocorrer uma interconversão de ILC1 em ILC3 e vice-versa. (Adaptado de Mortha and Burrows, 2018).

As ILC2 foram primeiramente descritas no tecido adiposo, sendo responsável por montar robusta resposta do tipo 2 (Moro et al., 2010). O primeiro trabalho que as identificaram no intestino, foi associando-as a um controle efetivo de infecções helmínticas (*Nippostrongylus brasiliensis*), onde foram chamadas de nuocytes (Neill et al., 2010). Neste trabalho, foi demonstrado que as ILC2 não são capazes de expandir na ausência de IL-33 e IL-25, bem como que esta população é responsável por uma robusta produção de citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5 e IL-13. Esta resposta do tipo 2 orquestrada pelas ILC2 se dá pela ação do fator de transcrição GATA3, importante tanto para diferenciação quanto manutenção desta população. (Neill et al., 2010; Hoyler et al., 2012; Oliphant et al., 2014)

Além de serem capazes de montar uma resposta do tipo 2, as ILC2 podem coordenar um perfil do tipo Th9 mediada por IL-25 contribuindo para resolução de infecção por nematódeos, como demonstrado no modelo de infecção por *Trichinella spiralis* (Walker

and McKenzie, 2013; Angkasekwinai et al., 2017). Foi demonstrado que em outros sítios, como pele e pulmão, estas células produtoras de IL-9, estimuladas por alarminas, contribuem para resolução da inflamação local, atuando como reguladoras da resposta imune, corroborando para integridade do epitélio (Roediger and Weninger, 2015).

Também é conhecido o envolvimento das ILC2s no desenvolvimento da asma alérgica (Scanlon and McKenzie, 2012) e no metabolismo de tecido adiposo (Molofsky et al., 2013) modificando tecido adiposo branco em marrom e sustentando subtipos celulares neste tecido – eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados -diminuindo o acúmulo de lípidos, bem como resistência à insulina (Brestoff et al., 2015; Spadoni et al., 2015).

Outro tipo celular que está intimamente ligada as ILC2 são os eosinófilos, que também possuem perfil de resposta do tipo 2. Ambos tipos celulares são fortemente estimulados pela presença de alarminas no meio (Scanlon and McKenzie, 2012). As ILC2 aparentemente controlam a manutenção de eosinófilos em estado homeostático ou inflamatório, pela secreção de IL-5 (Nussbaum et al., 2013). Além disso, durante a inflamação IL-13 é secretada, aumentando processos de eotaxia de eosinófilos (Molofsky et al., 2013). Sendo assim, estas células atuam em conjunto para formar uma potente resposta do tipo 2 no intestino (Nussbaum et al., 2013; Travers and Rothenberg, 2015).

1.1 Mucosite

A quimioterapia surgiu em 1940 como um tratamento que emprega agentes antineoplásicos isolados ou combinados, com a finalidade de eliminar as células tumorais do organismo. O tratamento quimioterápico gera efeitos tóxicos sobre as células tumorais, mas também afeta inúmeras células normais do organismo, especialmente aquelas de rápida proliferação, como as células da medula óssea e das mucosas em geral. Nesse contexto, a produção e circulação de células hematopoiéticas fica reduzida, resultando em aumento da incidência de infecções e hemorragias, que podem ser potencialmente fatais (Stitzel, 2005; Fonseca et al 2000). Além desses efeitos, as mucosas costumam ser acometidas por um processo de inflamação e ulcerações, conhecido como mucosite (Sonis et al., 2004; Logan et al., 2008).

A mucosite é o efeito adverso da terapia antineoplásica afetando as mucosas. Em pacientes que recebem radioterapia de cabeça e pescoço, a mucosite oral têm seu efeito potencializado. Em regimes de condicionamento usados para transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas, em que se utiliza de altas doses de quimioterápicos, cerca de 75% dos pacientes desenvolve mucosite oral. O desenvolvimento dessa complicação pode ter um alto custo ao paciente em tratamento para o câncer pois, além de dor, desconforto, limitações na nutrição e maior susceptibilidade a quebra de barreira intestinal predispondo o paciente a infecções, pode também significar a interrupção do tratamento, interferindo no controle do tumor local e na sobrevivência do paciente (Sonis, 2004; Cutler et al., 2005).

Além do prejuízo a qualidade de vida e suas consequências para a saúde dos pacientes o desenvolvimento deste efeito colateral também está associado a expressivo aumento do tempo e gastos com internações. Um estudo analisou 3 diferentes hospitais em Chicago (EUA) e constatou que a mucosite aumenta o tempo de hospitalização entre 5 e 14 dias e os custos com medicação e internação aumentam em média 18.515,00 dólares (Nonzee et al., 2008). Outro estudo, desenvolvido em Houston (EUA) aponta que há um aumento de cerca de 6.000,00 dólares nos gastos com tratamento (Elting et al., 2007).

Na sua forma mais branda, a mucosite apresenta uma lesão eritematosa atrófica em que a mucosa permanece intacta. Os pacientes têm uma sensibilidade semelhante a uma queimadura de alimentos, que pode ser gerido de maneira relativamente fácil. Por outro lado, pacientes com mucosite mais grave desenvolvem ulcerações que penetram completamente na submucosa causando dor grave que exige analgesia com narcóticos. Além dos sintomas da mucosite e seu impacto na qualidade de vida, essa doença afeta negativamente uma variedade de outros aspectos da saúde. Uma vez que a mucosa oral abriga uma vasta gama de microrganismos, a perda de integridade epitelial - especialmente quando os pacientes são submetidos a mieloblástica - aumenta significativamente o risco de bacteremia, fungemia e sepse (Sonis, 2004; Sonis et al., 2004; Al-Dasooqi et al., 2013).

O desenvolvimento da mucosite se dá em cinco fases: iniciação, regulação, amplificação, ulceração e cicatrização. Iniciação é a fase imediatamente após a exposição à radioterapia ou quimioterapia. Acredita-se que a quimioterapia e a radioterapia produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), radicais livres que causam

danos ao tecido e iniciam uma cascata de eventos biológicos causando dano ao DNA das células basais do epitélio e, conseqüentemente, morte celular (Sonis, 2004; Albuquerque, Soares and Silva, 2010; Peterson, Bensadoun and Roila, 2011). Na fase de iniciação, são produzidas moléculas, como enzimas que causam a apoptose, tendo como consequência uma mucosa delgada, eritematosa e dolorida (Sonis, 2004; Kanarek et al., 2014). Durante essa sequência de eventos inflamatórios desencadeados pelos quimioterápicos há aumento da expressão de fatores de transcrição, como NF κ B, fase que se denomina sinalização. Posteriormente tem-se a fase de amplificação, orquestrada pelo aumento da expressão de NF κ B, que regula genes que controlam a síntese de citocinas pró-inflamatórias. As quais são encontradas aumentadas no sistema circulatório dos pacientes. Algumas citocinas parecem ter papel fundamental no desenvolvimento da mucosite como IL-4, IL-18 e IL-33 (Soares, Maurício, et al., 2013; Lima-Júnior, 2014; Guabiraba et al., 2014).

Na fase de amplificação e sinalização, não somente os mediadores da fase dois, afetam a mucosa, bem como muitos outros, como ROS e NOS (Al-Dasooqi et al., 2013). Acredita-se que um dos mediadores importantes da sinalização/amplificação seja a citocina TNF- α , um excelente ativador de NF- κ B, que amplifica a inflamação (Kanarek et al., 2014). Essa fase pode ser definida como um feedback positivo que reforça a fase de amplificação, sendo fundamental para manutenção dos mediadores inflamatórios que culminarão no dano epitelial (Sonis, 2004; Al-Dasooqi et al., 2013).

A evolução do processo desde a iniciação até a amplificação resulta numa quarta fase: ulceração. É o ponto clínico crítico da mucosite, com exposição de terminações nervosas, colonização da superfície da mucosa por microrganismos, os quais despreendem toxinas, estimulam células inflamatórias e induzem quantidade adicional de citocinas pró-inflamatórias. Por fim, os pacientes são capazes de chegar à quinta fase, a cicatrização. Eventualmente a cura ocorre e, para isto, as moléculas, como a troponina I, se soltam da matriz extracelular do epitélio contínuo da úlcera, gerando divisão, migração e diferenciação celular em uma mucosa saudável (Sonis, 2004; Chiappelli, 2005; Al-Dasooqi et al., 2013).

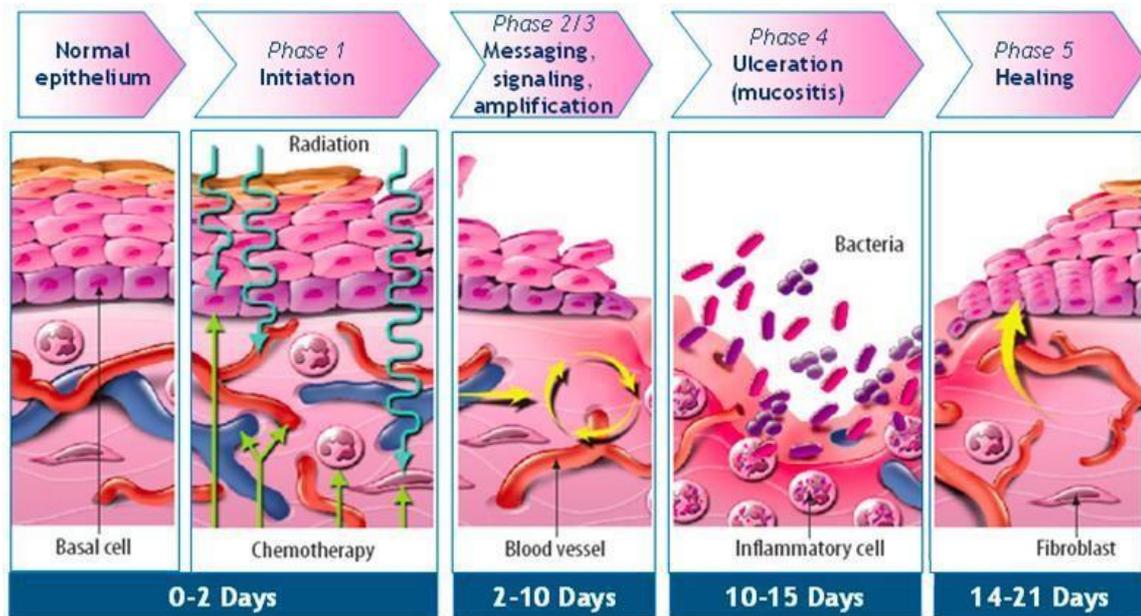


Figura 3: Desenvolvimento da mucosite. Iniciação - consiste em danos diretos ao DNA/RNA, lesão extensa de tecidos, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio, que desencadeia uma cascata de vias inflamatórias. Mensagem, sinalização e amplificação - ativação de uma série de vias de sinalização e fatores de transcrição, o mais importante NF- κ B. Isto faz com que haja síntese de moléculas inflamatórias (TNF- α , IL4, IL33, IL6 e IL1 β). Nesta fase observa-se amplificação do sinal por citocinas pró- inflamatórias, tais como TNF- α um ciclo de feedback positivo que reforça fase 2. Ulceração - A integridade do epitélio gastrointestinal é comprometida, possibilitando colonização bacteriana no local da úlcera, induzindo mais inflamação. Cicatrização - processo de auto resolução espontânea. (Modificado de: Sonis 2004)

Existem poucos estudos abordando mecanismos imunológicos envolvidos com a mucosite, tanto em pacientes quanto em modelos animais. Apesar desta escassez, alguns autores já elucidaram a participação de algumas citocinas no desencadeamento da mucosite.

Animais tratados com 5-FU, deficientes para IL-4, são protegidos do desenvolvimento da mucosite (Soares, Maurício, et al., 2013). Camundongos deficientes ou depletados para IL-18, tratados com irinotecano, não desenvolveram diarreia e outros parâmetros associados a esta condição (Lima-Junior et al, 2014). Da mesma forma, animais deficientes para ST2, receptor da IL-33, tratados com irinotecano, apresentaram mucosite menos severa e o bloqueio desta via de sinalização não prejudicou a citotoxicidade da droga ao tumor CT26 (Guabiraba et al., 2014). Experimentos em ratos demonstraram por imuno-histoquímica, que o tratamento com irinotecano é capaz de aumentar os níveis de IL-1 β e IL-6 associado a aumento de expressão do fator de transcrição pró-inflamatório NF κ B (Logan et al., 2008).

1.2 Doxorrubicina

A doxorrubicina é uma droga da classe antraciclina, derivada de cultura de *Streptomyces* ssp. Este composto é utilizado no tratamento de muitos tipos de câncer: leucemias, linfomas, câncer de mama, estômago, útero, ovário, bexiga e pulmão (Cutts et al., 2005; Cassinelli, 2016). Até a década de 50, só havia sido descrita a ação antibacteriana das antraciclina. Somente em 1960, na Itália, Di Marco realizou o fracionamento da cultura de *Streptomyces* de forma a concentrar compostos ativos, que foram posteriormente isolados: daunorrubicina e doxorrubina. A fim de averiguar a ação destes compostos, o grupo italiano tratou cultura de células HeLa com estas frações, onde constataram potente ação citotóxica das antraciclina. Apenas três anos depois, mediante parceria com instituições americanas, foram realizados estudos clínicos utilizando a Doxo como agente anticarcinogênico (Cassinelli, 2016). Já a partir da década de 70 essa droga tem sido amplamente utilizada na clínica.

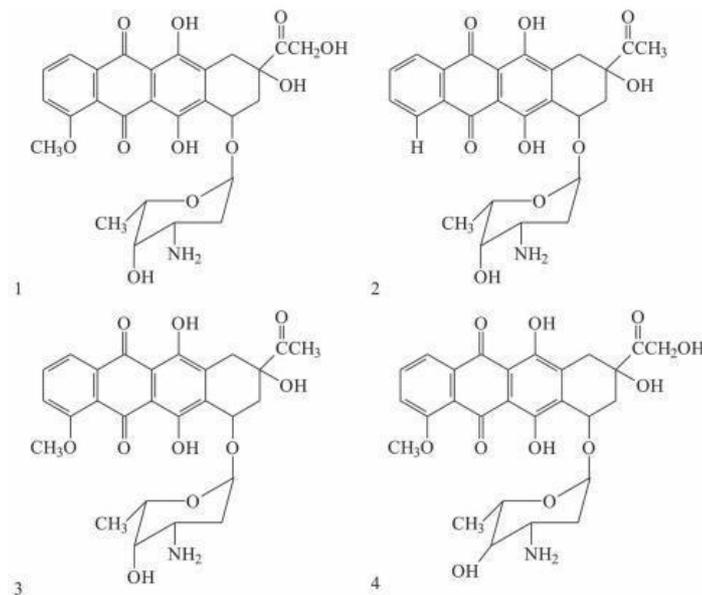


Figura 4: Estrutura molecular das antraciclina utilizadas na clínica. (A) Doxorrubicina, (B) Idarubicina, (C) Daunorubicina e (D) Epirubicina. (Modificado de: Cutts 2005)

Tabela 1: Datas da aprovação do uso de Daunomicina e Adriamicina. (Modificado de: Cassinelli 2016)

FI code	1 st Italian name	Patent			Approval	
		Italian application	USA issue	INN	Italy	USA
1762 B-101	Daunomicina	Nov 1962	1977 (FI)	Daunorubicin ^a	Daunoblastina June 1968	Daunorubicin 1979 ^b
1762 B-106	Adriamicina	Mar 1967	1971	Doxorubicin	Adriblastina Dec 1971	Adriamycin Aug 1974

FI = Istituto Ricerche Farmitalia; INN = international nonproprietary name.

^aRubidomycin (RP) US patent issued in 1976.

^bWyet, lves RP Licensee.

Apesar de haverem muitos estudos sobre a ação da Doxo, ainda não está claro qual o mecanismo de ação desta antraciclina. Em 1989 Bodley e colaboradores descreveram um dos mecanismos de ação da Doxo: quebra de DNA de fita dupla por inibição da Topoisomerase II. Este trabalho sugere que existem dois domínios da molécula de antraciclina que podem determinar algumas das propriedades biológicas desta classe de drogas. O primeiro está localizado na posição C-14 do anel de cromóforo e a segunda no nitrogênio-3' da fração daunosamina. Ambas porções são capazes de formar o complexo fármaco-topoisomeraseII-DNA. Conseqüentemente, a topoisomerase II não fica estabilizada e o complexo de clivagem não é formado. Com um número crescente de moléculas de fármaco intercaladas, a interação pode atingir um nível de saturação e resultar na quebra da fita dupla de DNA. (Bodley et al. 1989; Goto 2001)

Outro mecanismo de ação proposta para a Doxo é o dano em proteínas, DNA e membrana celular gerado por ROS. A doxorubicina é oxidada para semiquinona, um metabolito instável, que é convertido de volta para doxorubicina: um processo que libera ROS. As espécies reativas de oxigênio podem levar à peroxidação lipídica e danos à membrana e DNA, estresse oxidativo e desencadear vias apoptóticas de morte celular. (Thorn et al., 2011)

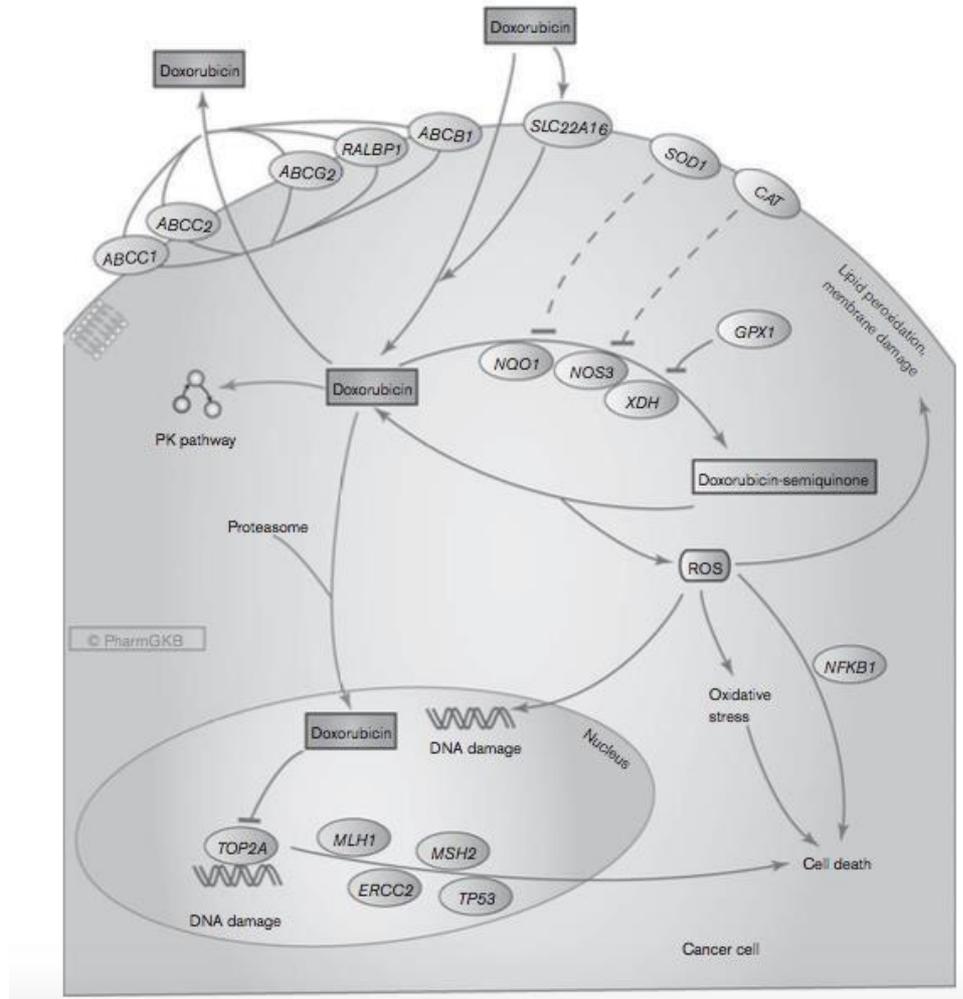


Figura 5: Representação da farmacodinâmica da Doxorubicina. A doxorubicina é oxidada para a semiquinona, um metabólito instável, que é convertida de volta à doxorubicina em um processo que libera espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio podem levar à peroxidação lipídica gerando danos à membrana, ao DNA, estresse oxidativo e desencadeiam as vias apoptóticas da morte celular. Os genes candidatos que podem modular essa via envolvem aqueles capazes de reação de oxidação (NADH desidrogenases, óxido nítrico sintases, xantina oxidase) e capazes de desativar os radicais livres, tais como glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Alternativamente, a doxorubicina é capaz de entrar no núcleo e impedir a ação de topoisomerase-II, também levando a dano em DNA e morte celular. (Modificado de: Thorn 2011)

Independentemente da quebra de fita dupla de DNA, drogas como a Doxo dissociam histonas de áreas cromossômicas abertas. A porção H2AX da histona - componente chave da resposta ao dano no DNA - também é destruída pelas antraciclinas trazendo consequências importantes para respostas de danos ao DNA, epigenéticas, transcrição e efeitos colaterais, dentre eles, a mucosite. (Pang et al., 2013)

Denard e colaboradores, em 2012, descreveram outro mecanismo citotóxico da doxorubicina. Segundo o grupo, a droga estimula a síntese de novo de ceramidas - precursor lipídico de membrana plasmática. Em resposta ao acúmulo de ceramidas, o fator de transcrição CREB3L1 é ativado. CREB3L1, após clivagem, é capaz de entrar no núcleo e ativar genes codificadores de inibidores de ciclo celular, como por exemplo

p21. Como consequência, a célula entra em apoptose.(Denard, Lee and Ye, 2012).

Do ponto de vista histomorfológico, a Doxo induz morte celular, apoptose, especialmente em células tronco intestinais, prejudicando o processo de renovação epitelial, fundamental para a manutenção das condições fisiológicas do intestino. A mucosite por Doxo apresenta-se de forma muito aguda com altos índices de morte celular em eventos iniciais da injúria, já a partir de 6 horas após inoculação da droga.(Dekaney et al., 2009) Camundongos deficientes para TLR2 e TLR9 apresentam mucosite mais branda e são mais resistentes a apoptose epitelial em modelo de mucosite induzida por Doxo, sugerindo um papel importante dos TLRs e da inflamação na indução ou ampliação da apoptose de células epiteliais com consequências na ulceração intestinal e na translocação bacteriana(Wardill and Bowen, 2018).

A literatura sobre a mucosite ainda é muito escassa. Não se sabe se a morte celular da camada epitelial do intestino é uma causa ou uma consequência da mucosite. E, apesar de sabermos que a mucosite é pautada em uma resposta do tipo dois, a qualidade do infiltrado inflamatório da lâmina própria ainda não foi estabelecida. Tão pouco o envolvimento de ILCs nesta patologia. Entretanto, pelo fato da mucosite ser uma patologia antígenicamente inespecífica e muito aguda, faz-se relevante avaliar se as ILC2 teriam participação importante no processo imunológico envolvido na mucosite. Assim, nosso objetivo é elucidar mecanismos imunológicos associados a mucosite, a fim de compreender as diversas facetas do sistema imune frente a um ambiente inflamatório utilizando o modelo de mucosite por Doxorrubina, uma droga largamente empregada e pouco estudada nesse contexto.

2 Objetivos

2.1 *Objetivo geral*

Avaliar a dinâmica do processo inflamatório envolvido na mucosite experimental induzida por Doxorubicina.

2.2 *Objetivos específicos*

- ✓ Analisar a cinética de alterações histopatológicas do íleo de animais acometidos pela mucosite;
- ✓ Verificar a dinâmica e a qualidade do infiltrado celular durante a evolução da mucosite
- ✓ Verificar o fenótipo das populações de linfócitos da lâmina própria do intestino delgado durante a mucosite;
- ✓ Verificar o perfil cinético da expressão de citocinas produzidas no intestino delgado de animais com mucosite;
- ✓ Verificar a evolução da permeabilidade intestinal de animais com mucosite.

- ✓ Testar modelos de animais geneticamente deficientes (ex. ST2 KO, GATA1KO, RAG1 KO e NSG KO) a fim de elucidar mecanismos imunológicos do desenvolvimento deste efeito adverso.

- ✓ Verificar se pacientes sob tratamento quimioterápico tem alteração de eosinófilos e ILC2s no sangue periférico.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Camundongos C57BL/6 e BALB/c foram obtidos no biotério Central da UFMG. Camundongos BALB/c e ST2 KO, deficiente para o receptor de IL33, foram cedidos pela Dra. Ana Maria Caetano de Faria; já os camundongos GATA1 KO, deficiente para eosinófilos e NSG KO, deficientes para T, B, NK e ILCs, foram cedidos pelo Dr. Mauro Martins Texeira. Independente da linhagem, foi utilizado fêmeas, livre de patógenos específicos, com 6-8 semanas de idade. No decorrer do delineamento experimental os mesmos foram mantidos no Biotério Experimental Ênio Cardillo Vieira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia. No Biotério Experimental os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com no máximo cinco indivíduos por gaiola tendo água e dieta ofertados livremente. As condições ambientais foram controladas, sendo ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura em torno de 28°C.

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo número 331/2012.

3.2 Delineamento Experimental

Camundongos (BALB/c, ST2 KO, GATA1 KO, NSG KO, C57BL/6 e RAG1 KO) foram pesados e divididos em grupos experimentais (Tabela 1) de maneira randomizada. Os animais do grupo controle (Sham) receberam 100µL de solução salina por administração intraperitoneal (i.p.), enquanto os grupos Doxo receberam 10mg/Kg via i.p. de doxorrubina.

A eutanásia se deu em diversos momentos: 06 e 24 horas, 3, 5 e 7 dias após a indução da mucosite. Na eutanásia, foram retirados intestino delgado e sangue. Posteriormente, o intestino delgado foi dividido em partes (duodeno, jejuno distal, jejuno proximal, íleo). A porção distal do íleo (aproximadamente 1cm) foi congelado a -80o C para avaliação da expressão de citocinas. O restante do íleo foi utilizado para análises histológicas e

morfométricas. Toda a extensão do intestino delgado foi utilizada para análise do perfil de células, por citometria de fluxo.

3.3 Eutanásia

Os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 0,1 ml de uma solução contendo 1,7 mg do anestésico cloridrato de quetamina misturado a 0,33 mg do relaxante muscular 2-(2,6-xilino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (xilazina) diluídos em tampão fisiológico. Após anestesia geral, o sangue dos animais foi retirado pela veia axilar. Posteriormente, os animais foram submetidos ao deslocamento cervical e então a retirada de órgãos foi realizada.

3.4 Análise histológica

Amostras do íleo dos camundongos foram fixados em metanol/DMSO (10%) e processados para análise histológica. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. A morfometria da altura de vilos e profundidade de criptas, foram obtidas a partir de fotos de lâminas histológicas analisadas no software ImageJ 1.49v. Foram computados 10 campos aleatórios por animal, tendo a integridade do tecido como fator limitante.

3.5 Leucócitos da lâmina própria

Para a realização do protocolo de retirada de linfócitos da lâmina própria foram utilizadas as soluções: Buffer A (HBSS (Hank's balance salt solution) + 5% SBF (soro fetal bovino) + HEPES a 25 mM (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico)); Buffer B (HBSS + 2 mM EDTA + 25 mM HEPES); Buffer C (HBSS + 15 mM HEPES + 5 mM EDTA + 10% SBF + 0,015% DTT (Ditiotreitol)); Iscove's completo (Iscove's + 10% SBF + 1% penicilina/estreptavidina + 7,5% de HEPES + 0,1% de 2-mercaptoetanol + 1% de glutamina + 0,06 mg/mL Liberase + 100 µg/mL Dnase)

O intestino delgado foi removido e lavado com 20 mL de HBSS gelado. Toda gordura aderida e as placas de Peyer foram cuidadosamente removidas. Os intestinos foram abertos longitudinalmente e cortados em pedaços de 0,5-1,0 cm, transferidos para placa de petri com

5mL de Buffer A e homogeneizados por 5 minutos. Posteriormente o meio foi descartado e esta etapa foi repetida. Após descartar o Buffer A, pela segunda vez, as amostras foram transferidas para tubos falcon de 15mL, com 5mL de Buffer A, agitados em vórtex e o sobrenadante foi descartado. As amostras foram novamente transferidas para tubos falcon de 15mL, agora com 10mL de Buffer B, agitadas em vórtex e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente as amostras foram encubadas, em falcon de 15mL contendo 5mL de Buffer C pré-aquecido (37°C), em homogeneizador orbital durante 15 minutos a 37°C.

Os fragmentos de intestinos foram transferidos para tubos de fundo em "U" com 5mL de Buffer A, agitadas vigorosamente e o sobrenadante coletado, pois nesta fração encontram-se as células da camada epitelial do intestino. Este procedimento é repetido e posteriormente os fragmentos de intestinos são cortados em pequenos pedaços, com auxílio de tesoura cirúrgica. Após este passo o tecido é retornado aos tubos de fundo "U" com 5mL de Buffer A e são centrifugados por 7 minutos a 1500 RPM a 4°C, o sobrenadante é descartado e é adicionado 5mL de meio Iscov's completo pré-aquecido a 37°C e foram encubadas em homogeneizador orbital durante 60 minutos a 37°C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 5mL de Buffer A e mantidos no gelo por 2 minutos. Posteriormente as amostras foram passadas em rede de 100µm, o filtrado foi coletado e submetido à centrifugação novamente. O pellet foi ressuspensionado em 5mL de Buffer B, os fragmentos de intestinos foram homogeneizados com seringa e novamente filtrados em redes de 70µm, o filtrado foi coletado, novamente submetido à centrifugação e o pellet ressuspensionado em 2mL de Buffer A para contagem de células.

A contagem do número de células viáveis foi feita em câmara de Newbawer. Foi utilizada uma diluição 1:2 da suspensão de células com solução de azul de trypan. Foram consideradas vivas as células que não foram coradas pelo corante.

3.6 Citometria de Fluxo

Células da lâmina própria previamente isoladas, de acordo com o protocolo descrito acima, foram submetidas a análise por citometria de fluxo com o intuito de distinguir as populações celulares presentes no intestino delgado durante o desenvolvimento da mucosite induzida por Doxo. Para isto foram utilizados painéis para identificar linfócitos B, linfócitos T, células T reguladoras, células da mielóides da Imunidade Inata e Células Linfóides Inatas (ILCs). Após o

término das marcações os dados foram adquiridos no citômetro BD LSRFortessa utilizando o software BD FACSDiva e as análises realizadas com auxílio do programa FlowJo V10.1.

3.6.1 Painel Imunidade Inata

A marcação deste painel é capaz de detectar basófilos, células dendríticas, eosinófilos, macrófagos, monócitos, neutrófilos e NKs. Para realizar esta marcação, as células foram pipetadas em placa específica (1x10⁶ células por poço), seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (50 µL), cuja quantidade dos anticorpos utilizados é descrita na tabela 3. Após incubação de 30 minutos, ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 100 µL de tampão FACS (0,5% de albumina bovina sérica diluída em PBS), centrifugadas a 1.500 rpm, por 10 minutos, e fixadas com 100 µL de paraformaldeído em incubação de 20 minutos. Após uma nova lavagem, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão FACS para a realização da aquisição.

A estratégia de gate para análise deste painel, foi iniciada a partir dos dados de tamanho e granulosidade (SSC-A x FSC-A) para a delimitação do gate de linfócitos, células pequenas e pouco granulosas, e de outros leucócitos, células de tamanho variado e maior granulosidade que incluem exatamente as células do sistema imune inato. Em seguida foi demarcado o gate de células únicas ou singlets (FSC-H x FSC-A), para excluir possíveis grumos celulares, e também o gate de time (SSC-A x TIME) para exclusão de eventuais interrupções na aquisição. A partir da demarcação destes três gates foi utilizada a ferramenta Boolean Gate com a opção Make and Gate, para gerar a interseção destas três populações.

Considerando-se a população de linfócitos, uma nova demarcação a partir do gate de SSC-A x CD19 (Alexa Fluor 700) delimitou a população de linfócitos B, que é positiva para este marcador. Já os gates para determinação das células do sistema imune inato foram delimitados a partir da população de outros leucócitos. O primeiro deles, CD49 (FITC) x FC RI (PE/Cy7) foi capaz de distinguir duas populações: NKs (CD49+FCeRI -) e basófilos (CD49+ FCeRI +). A população de eosinófilos foi determinada pelo gate de CD11bint (APC) x SiglecF+ (PE-CF594) e os neutrófilos por CD11b+ x Ly6G+ (PE). Em seguida foram analisadas as populações relacionadas com Ly6C (BV605) e Ly6G sendo a população negativa para os dois marcadores utilizada para determinação de macrófagos e células dendríticas, e a população Ly6C+ Ly6G- utilizada para determinação dos monócitos. Para complementar a determinação

dos monócitos foi realizado o gate de SSC-A x CD11b, sendo que os monócitos correspondem a população positiva para este marcador. Dentro da população Ly6C- Ly6G- foi delimitado o gate de CD11b^{high} SiglecF- que determina os macrófagos, e também CD11c⁺ (PercP Cy5.5) x IAIE^{high} (BV 510), que delimita as células dendríticas. A população de macrófagos foi submetida a uma nova análise, a partir de CD11c, considerando a população positiva para este marcador como macrófagos do tipo M1.

Tabela 2: Anticorpos utilizados no painel de Imunidade Inata, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em μL , para marcação de 1×10^6 células.

Anticorpo	Fluorocromo	Quantidade (μL)
CD11b (Biolegend #101211)	APC	0,01
CD11c (BD Pharmingen #560584)	PercP/Cy5.5	0,03
CD49 (Biolegend #108905)	FITC	0,25
FC RI (Biolegend #134317)	PE/Cy7	1,25
IAIE (Biolegend #107635)	BV510	0,31
Ly6C (Biolegend #128035)	BV605	0,15
Ly6G (Biolegend #127607)	PE	0,03

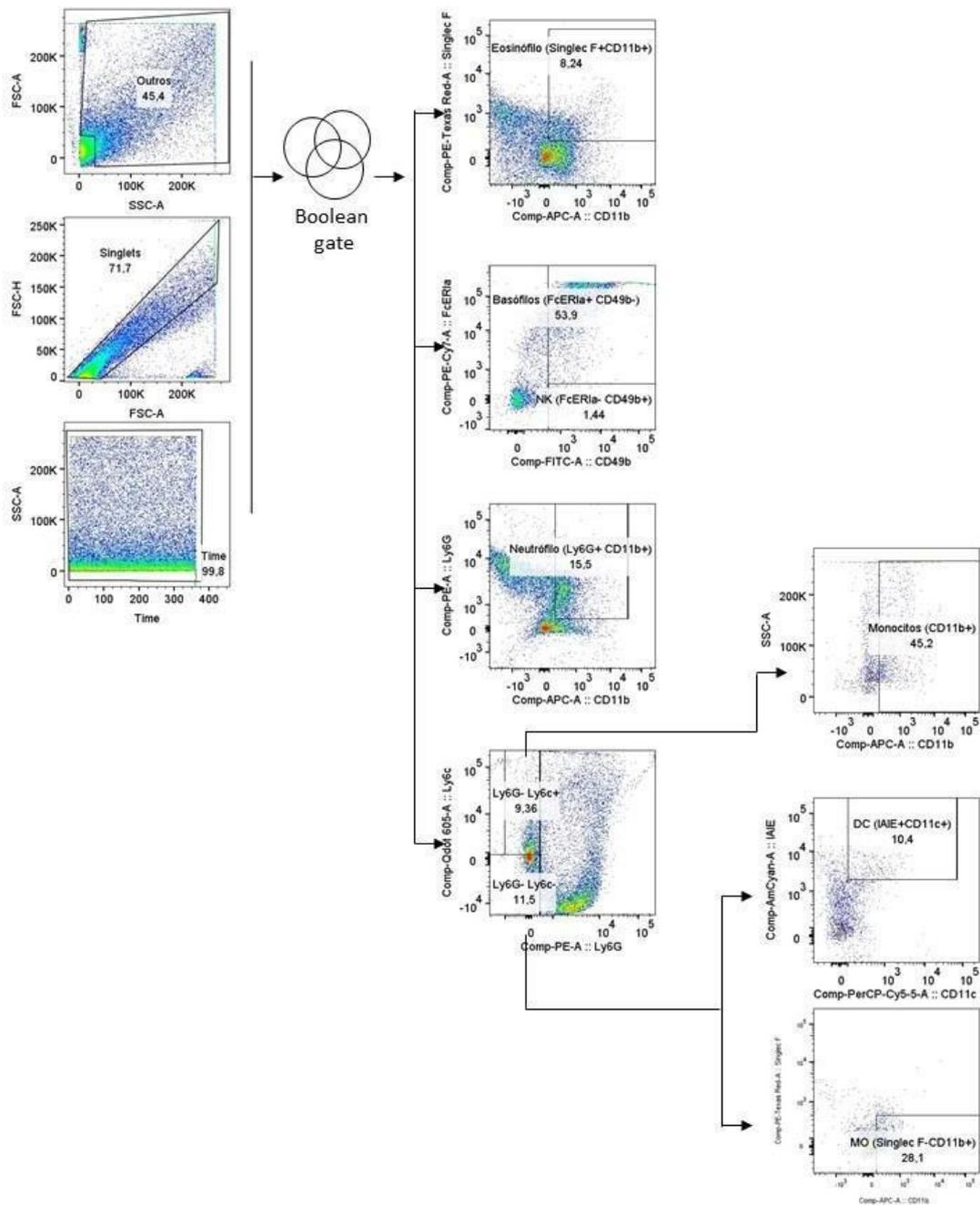


Figura 6: Estratégia de gate painel de Imunidade Inata. Inicialmente foram delimitados os *gates* de leucócitos (SSC-A x FSC-A), *singlets* (FSC-H x FSC-A) e *time* (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos foram determinadas as populações de NKs (CD49+ FcεR1a-), basófilos (CD49+ FcεR1a+), eosinófilos (CD11bint SiglecF+) e neutrófilos (CD11b+ Ly6G+). A partir do gate de Ly6C+ x Ly6G-, foram delimitados os monócitos (SSC-A x CD11b) e por fim, considerando Ly6C- x Ly6G-, foram delimitadas as populações de macrófagos (CD11bhigh SiglecF-) e células dendríticas (CD11c+ IAIE high)

3.6.2 Painel Células Linfoides Inatas e Linfócitos T

A partir da marcação deste painel foi possível distinguir além das subpopulações de ILC (ILC 1, 2 e 3), as células T helper e suas subpopulações (Th1, Th2, Th17) e as células T citotóxicas. O processo de marcação extra e intracelular ocorreu da mesma maneira descrita para o painel de células T reguladoras, e a quantidade dos anticorpos utilizados está descrita na tabela 5.

Para análise das subpopulações de ILC a população de linfócitos, resultante da interseção dos gates de linfócitos, singlets e time, foi analisada considerando linhagem negativa (CD11b, CD11c, CD16, CD19, FcεRI - Pacific Blue) x CD3 (Alexa Fluor 700), sendo selecionada a população negativa para todos os marcadores. Posteriormente, considerando SSC-A x CD45 (BV570) foi delimitada a população CD45+, que em seguida ao ser analisada por CD127 (BV510) x Tbet (PE) / GATA 3 (Alexa Fluor 488) / RORgt (PE-CF594), resultou, respectivamente, nas ILC 1, 2 e 3.

As populações de células T também foram delimitadas a partir do gate de linfócitos, porém considerando as células CD3+. Em seguida foram demarcadas as populações positivas para CD4 (PE/Cy7) ou CD8 (PercP/Cy5.5). Dentro das células consideradas CD4+, a partir dos fatores de transcrição Tbet, GATA 3 e RORgt foi possível identificar as células Th1, Th2 e Th17 respectivamente.

Tabela 3: Anticorpos utilizados no painel de Células Linfoides Inatas e Linfócitos T, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em μL , para marcação de 1×10^6 células.

Anticorpo	Fluorocromo	Quantidade (μL)
CD3 (Biolegend #100215)	Alexa Fluor 700	0,06
CD4 (Biolegend #116015)	PE/Cy7	0,03
CD8 (Biolegend #100733)	PercP/Cy5.5	0,625
CD11b (Biolegend #101223)	Pacific Blue	0,25
CD11c (Biolegend #117321)	Pacific Blue	0,25
CD16 (BD Horizon #560539)	Pacific Blue	0,01
CD19 (Biolegend #115526)	Pacific Blue	0,01
CD45 (Biolegend #103135)	BV570	0,07
CD127 (Biolegend #135033)	BV510	0,625
FceRI (Biolegend #134313)	Pacific Blue	2,5
GATA3 (Biolegend #653807)	Alexa Fluor 700	0,625
RORgt (BD Horizon #562684)	PE-CF594	0,07
Tbet (Biolegend #644809)	PE	0,625

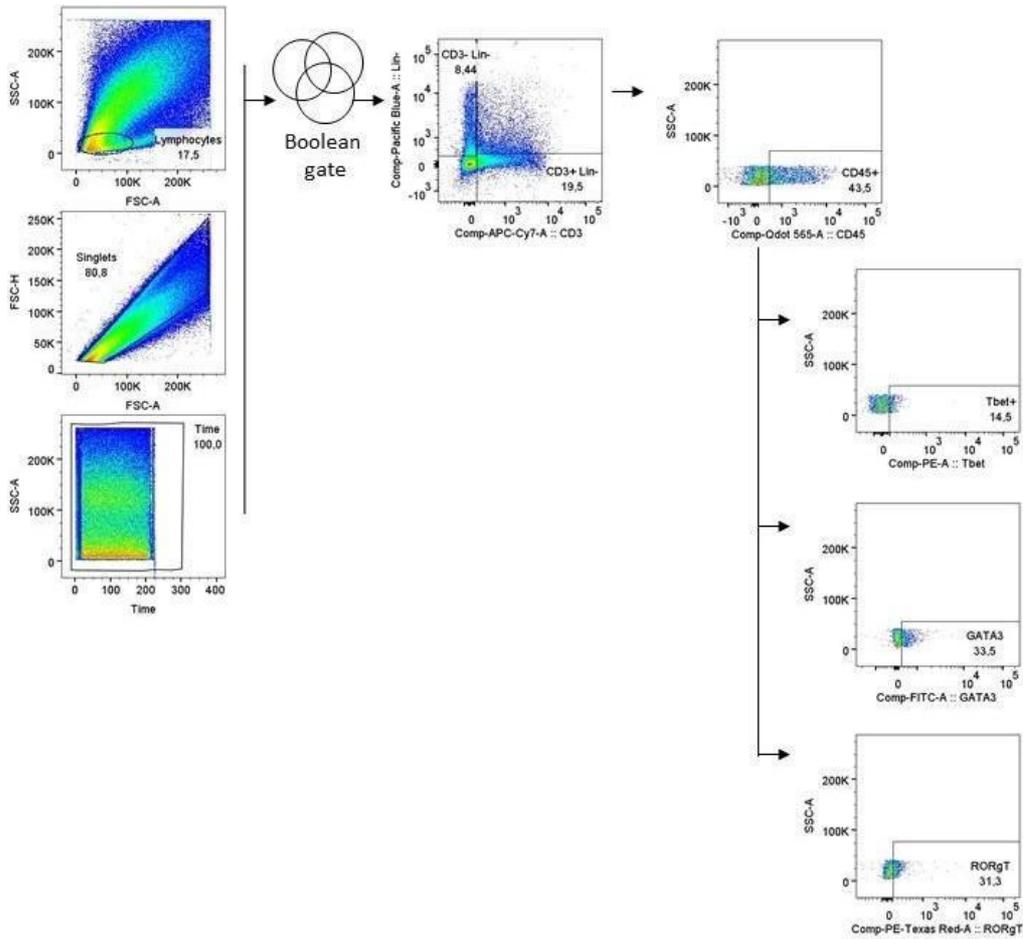


Figura 7: Estratégia de gate painel Células Linfoides Inatas. Inicialmente foram delimitados os *gates* de linfócitos (SSC-A x FSC-H), *singlets* (FSC-H x FSC-A) e *time* (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos a população de linfócitos resultantes foi analisada em linhagem negativa x CD3, sendo selecionada a população negativa para ambos os marcadores. Em seguida foi delimitada a população CD45+, que a partir do gate de CD127+ associado aos fatores de transcrição Tbet, GATA 3 e RORγt resultou nas populações de ILC1, 2 e 3 respectivamente.

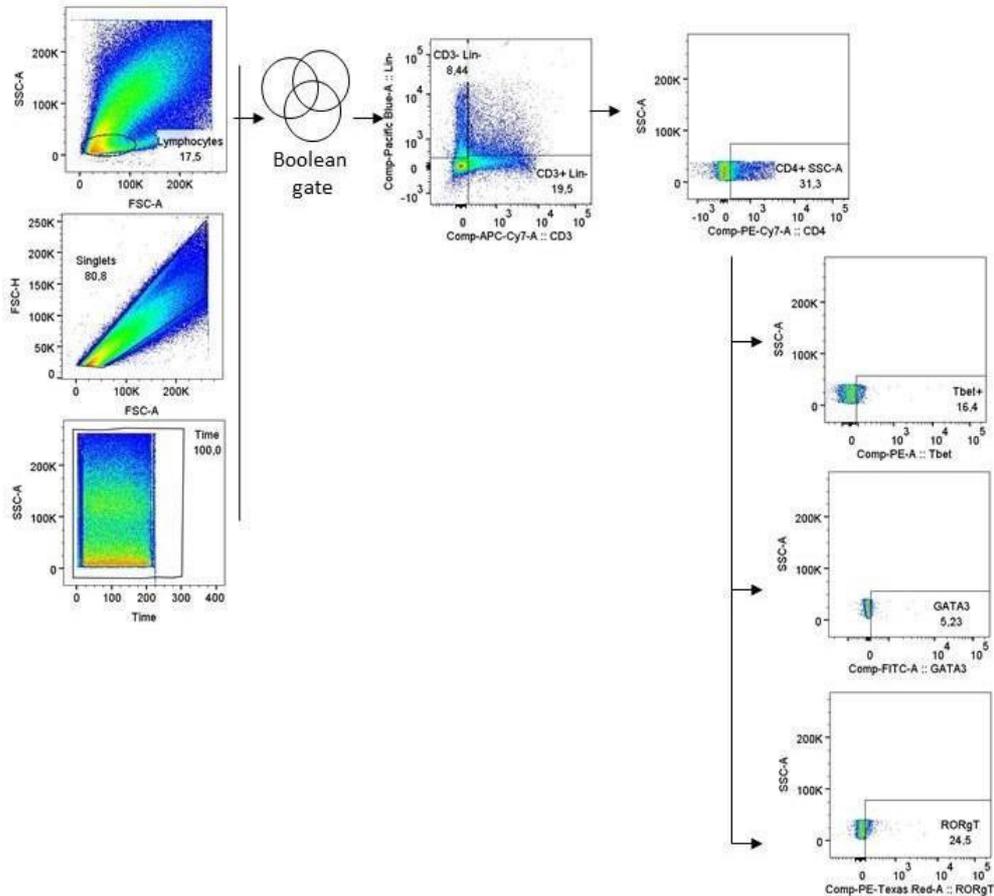


Figura 8: Estratégia de gate painel Linfócitos T. Inicialmente foram delimitados os gates de linfócitos (SSC-A x FSC-H), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos a população de linfócitos resultante foi analisada em linhagem negativa x CD3, sendo selecionada a população positiva apenas para CD3. Em seguida o gate de CD4 x CD8 resultou nas células T citotóxicas (CD8+) e T helper (CD4+), esta última ao ser analisada pelos fatores de transcrição Tbet, GATA 3 e RORg t resultou nas subpopulações, Th1, Th2 e Th17, respectivamente.

3.6.3 Painel Necrose e Apoptose

A marcação deste painel é capaz de detectar necrose e apoptose em células epiteliais, células tronco e linfócitos. Para realizar esta marcação, as células foram pipetadas em placa específica (1x10⁶ células por poço), seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (50 µL), cuja quantidade dos anticorpos utilizados é descrita na tabela 3. Após incubação de 30 minutos, ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 100 µL de tampão FACS

(0,5% de albumina bovina sérica diluída em PBS) e submetidas a incubação com 7- AAD por 15 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente as células foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos e ressuspendidas em solução contendo Anexina V, após esta etapa as amostras foram adquiridas em um prazo máximo de 15 minutos, como indica o fabricante.

A estratégia de gate para análise deste painel foi iniciada a partir dos dados de tamanho e granulosidade (SSC-A x FSC-A) para a delimitação do gate de linfócitos e células grandes e pouco granulosas, que incluem exatamente as células do sistema imune e células epiteliais. Posteriormente foi demarcado o gate de células únicas ou singlets (FSC-H x FSC-A), para excluir possíveis grumos celulares, e também o gate de time (SSC-A x TIME) para exclusão de eventuais interrupções na aquisição. A partir da demarcação destes três gates foi utilizada a ferramenta Boolean Gate, opção Make and Gate, para gerar a interseção destas três populações. Considerando-se a população de linfócitos, uma nova demarcação a partir de CD3+ (APC Cy7) x CD45+ (BV570) delimitou a população de linfócitos no epitélio, que é positiva para este marcador. Já os gates para determinação das células do epiteliais, SSC-A x CD325+ (PE Cy7) e stem cells, SSC-A x Lgr-5 (PE) foram delimitados a partir da população total. Posteriormente, foi delimitada a parcelas de células em apoptose precoce, 7AAD- (PercpCy5.5) x AnevinV+ (APC), apoptose tardia, 7AAD+ (PercpCy5.5) x AnevinV+ (APC), e necrose, 7AAD+ (PercpCy5.5) x AnevinV- (APC).

Tabela 4: Anticorpos utilizados no painel de Necrose e Apoptose, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em μL , para marcação de 1×10^6 células.

Anticorpo	Fluorocromo	Quantidade (μL)
Anexina V (Biolegend #640920)	APC	2,5
7-AAD (Biolegend #420404)	PercP Cy5.5	1,25
CD326 (Biolegend #118216)	PE Cy7	0,325
Lgr5 (R&D # FAB8078P)	PE	10
CD3 (Biolegend #100215)	APC Cy7	2,5
CD45 (Biolegend #103135)	BV570	0,7

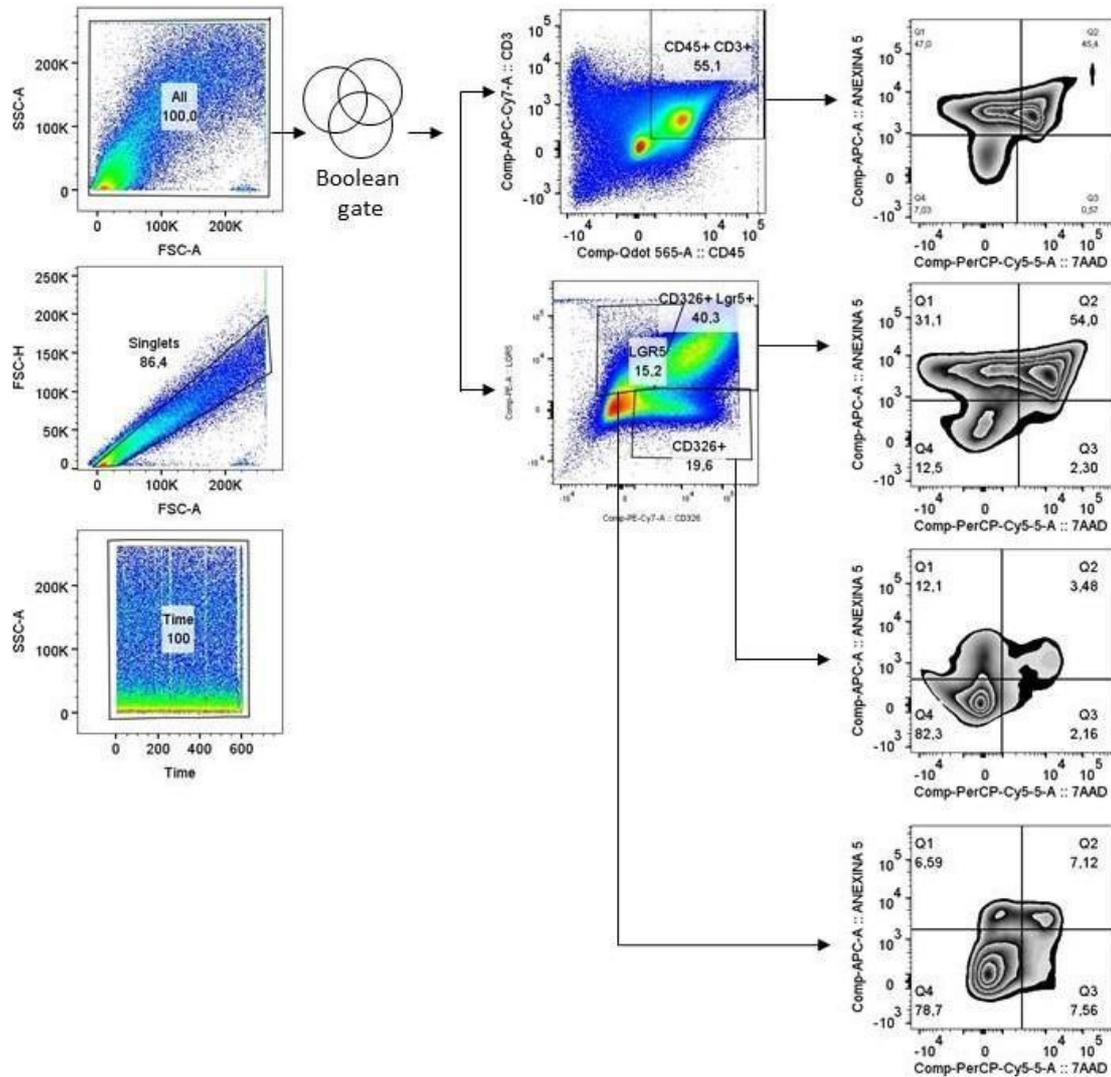


Figura 9: Estratégia de gate painel Morte celular. Inicialmente foram delimitados os gates de linfócitos (SSC-A x FSC-H), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos a população de linfócitos resultante foi analisada em CD45 x CD3, sendo selecionada a população duplo positiva. Dentro desta população delimitamos o gate Anexina V x 7AAD para análise dos eventos de morte celular. A partir do boolean gate analisamos Lgr5 x CD326, onde stem cells são apenas Lgr5+, células epiteliais são apenas CD326+, também analisamos a população intermediária Lgr5+ CD326+. Dentro desses gates selecionamos Anexina V x 7AAD para análise dos eventos de morte celular.

3.6.4 Painel Proliferação

A marcação deste painel é capaz de detectar proliferação em células epiteliais, células tronco e linfócitos. Para realizar esta marcação, as células foram pipetadas em placa específica (1x10⁶ células por poço), seguidas pelo mix de anticorpos extracelulares (50 µL), cuja quantidade dos anticorpos utilizados é descrita na tabela 3. Após incubação de 30 minutos, ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 100 µL de tampão FACS (0,5% de albumina bovina sérica diluída em PBS) e submetidas a incubação com 7- AAD por 15 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente as células foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos e ressuspendidas em solução contendo Anexina V, após esta etapa as amostras foram adquiridas em um prazo máximo de 15 minutos, como indica o fabricante.

A estratégia de gate para análise deste painel foi iniciada a partir dos dados de tamanho e granulosidade (SSC-A x FSC-A) para a delimitação do gate de linfócitos e células grandes e pouco granulosas, que incluem exatamente as células do sistema imune e células epiteliais. Posteriormente foi demarcado o gate de células únicas ou singlets (FSC-H x FSC-A), para excluir possíveis grumos celulares, e também o gate de time (SSC-A x TIME) para exclusão de eventuais interrupções na aquisição. A partir da demarcação destes três gates foi utilizada a ferramenta Boolean Gate, opção Make and Gate, para gerar a interseção destas três populações.

Considerando a população de linfócitos, uma nova demarcação a partir de CD3⁺ (APC Cy7) x CD45⁺ (BV570) delimitou a população de linfócitos no epitélio, que é positiva para este. Já os gates para determinação das células do epiteliais, SSC-A x CD325⁺ (PE Cy7) e stem cells, SSC-A x Lgr-5 (PE) foram delimitados a partir da população total. Posteriormente às populações delimitadas, foi delimitada a parcelas de células em proliferação, SSC-A x Ki-67 (Alexa 488).

Tabela 5: Anticorpos utilizados no painel de Proliferação, de acordo com o fluorocromo e a quantidade, em μL , para marcação de 1×10^6 células.

Anticorpo	Fluorocromo	Quantidade (μL)
Ki-67 (Biolegend # 350508)	Alexa 488	2,5
CD326 (Biolegend #118216)	PE Cy7	0,325 .
Lgr5 (R&D # FAB8078P)	PE	10 .
CD3(Biolegend #100215)	APC Cy7	2,5
CD45(Biolegend #103135)	BV570	0,7

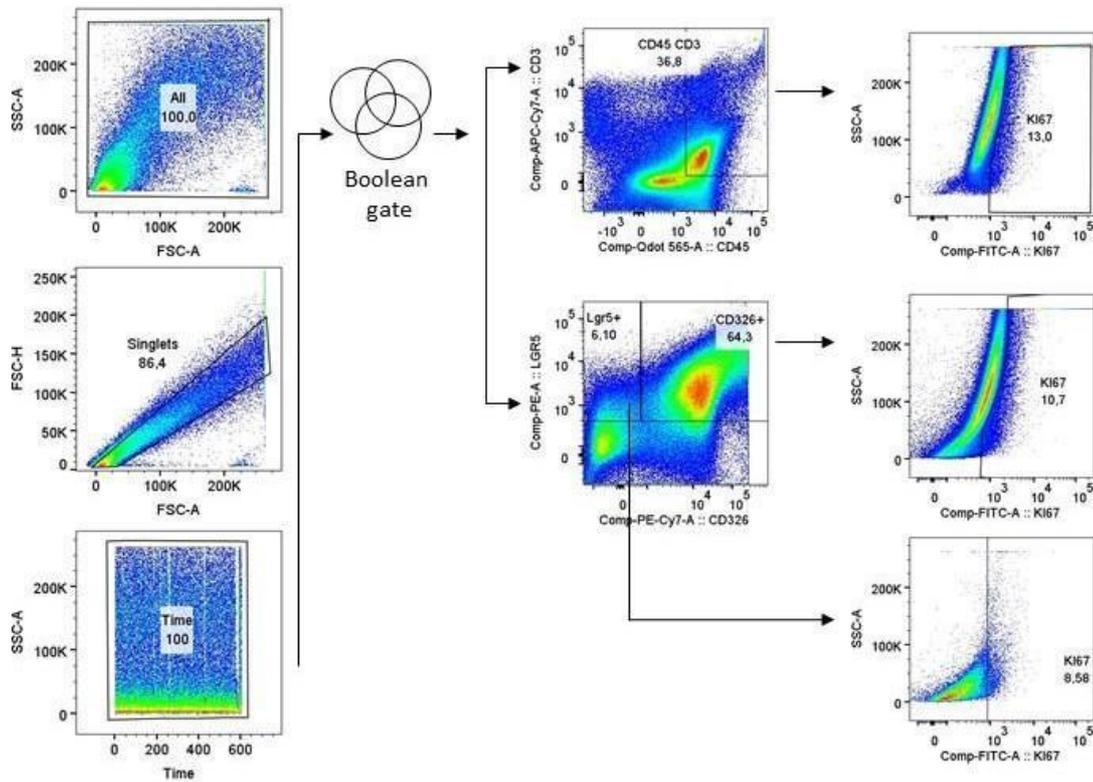


Figura 10: Estratégia de gate painel Morte celular. Inicialmente foram delimitados os gates de linfócitos (SSC-A x FSC-H), singlets (FSC-H x FSC-A) e time (SSC-A x TIME) e a partir da interseção dos mesmos a população de linfócitos resultante foi analisada em CD45 x CD3, sendo selecionada a população duplo positiva. Dentro desta população delimitamos o gate SSC-A x KI-67 para análise dos eventos de proliferação celular. A partir do boolean gate analisamos Lgr5 x CD326, onde stem cells são apenas Lgr5+, células epiteliais são apenas CD326+. Dentro desses gates selecionamos SSC-A x KI-67 para análise dos eventos de proliferação celular.

3.6.5 Painel Sorting

A marcação deste painel tem o intuito de fazer separação de um populações específicas: T e ILC2s. Para realizar esta marcação, as células foram pipetadas em tubos Falcon de 15mL e a marcação de deu de acordo com o número de células adquiridas, cuja quantidade dos anticorpos utilizados é descrita na tabela 3. Após incubação de 30 minutos, ao abrigo da luz, as células foram lavadas com 100 μ L de tampão FACS (0,5% de albumina bovina sérica diluída em PBS) e foram levadas ao FACS Aria II da Plataforma de Citometria do Instituto de Pesquisa Renée Rachou – Fiocruz/MG.

Tabela 6: Anticorpos utilizados no painel de Sorting, de acordo com o flurocromo e a quantidade, em μ L, para marcação de 1×10^6 células.

Anticorpo	Fluorocromo	Quantidade (1×10^6)
CD11b (Biolegend #101223)	PE	0,25
CD11c (Biolegend #117321)	PE	0,25
CD16 (BD Horizon #560539)	PE	0,01
CD19 (Biolegend #115526)	PE	0,01
FceRI (Biolegend #134313)	PE	2,5
CD127 (Biolegend #135033)	FITC	2
ST2 (BD Horizon #)	APC	2,5
CD3 (Biolegend #100215)	Alexa Fluor 700	0,06

3.7 Análise da expressão gênica

Para avaliar a expressão de citocinas no intestino delgado, foi extraído 1cm do íleo distal, colocado em tubo eppendorf livre de RNase e congelado a -70°C até o momento do uso. Antes da realização da análise, o tecido precisou ser submetido a diversos procedimentos, iniciando com a extração de RNA, seguido de síntese de cDNA, para possibilitar então a quantificação da amplificação do cDNA por qPCR (reação quantitativa em cadeia da polimerase).

3.7.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA, inicialmente uma pequena porção distal do íleo associado a 1 mL de trizol (TRI reagente, Sigma-Aldrich #T9424) foi submetido a maceração por homogeneizador de tecidos. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio (CHCl₃) seguido de agitação vigorosa por 30 segundos, incubação a temperatura ambiente por cinco minutos e centrifugação a 13.000 rpm, 4°C por 15 minutos. A fase superior resultante da centrifugação, foi transferida para outro eppendorf contendo 500 µL de isopropanol (C₃H₈O) e os líquidos misturados por inversão durante um minuto. Para auxiliar a precipitação do RNA, os tubos foram incubados a -70°C por 90 minutos.

Ao término do período de incubação, as amostras foram centrifugadas, novamente, por 13.000 rpm, 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e para lavagem do pellet formado, foi acrescido ao tubo 1 mL de etanol 75% gelado, seguido de centrifugação nas mesmas condições, porém por 10 minutos. Após a repetição do processo de lavagem, os eppendorfs permaneceram abertos para evaporação de todo o etanol restante. Por fim, para ressuspensão do pellet foi acrescido ao tubo 30 µL de água livre de RNase. Para facilitar a dissolução do pellet na água, os tubos foram incubados em banho maria, a 55°C por 10 minutos.

A concentração do RNA, em ng/µL, foi mensurada a partir da leitura em espectrofotômetro (Spectrophotometer ND-1000). Para evitar degradação, o RNA permaneceu armazenado a -70°C até a síntese do cDNA.

3.7.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA ocorreu a partir da transcrição do RNA em cDNA por meio da ação da transcriptase reversa (M-MLV RT). Inicialmente um micrograma de RNA foi diluído em 5 µL de água livre de RNase, e a esta diluição foi adicionado ainda 0,5 µL de Oligo (dT) 15 primer (Promega #C1101). Este homogenato permaneceu no termociclador (PTC-100TM, MJ Research, Inc) a 72oC por 5 minutos.

Na etapa seguinte, sem retirar os tubos do termociclador foi acrescentado um mix contendo: 2 µL de tampão 5x de M-MLV, 0,5 µL de M-MLV RT (Promega #M1705), 0,5 µL de dNTP Mix (Promega #U1515), 0,1 µL de inibidor de ribonuclease (Promega #N2511) e 0,25 µL de água. Os 42oC, seguido de aquecimento a 72oC por 15 minutos e resfriamento a 4oC. Após retirar os tubos do termociclador, houve diluição do cDNA formado a partir da adição de 90 µL de água livre de RNase. O cDNA obtido foi armazenado a -20oC até a realização de qPCR.

3.7.3 Amplificação do cDNA por qPCR

2 µL de cDNA foram pipetados, em duplicata, na placa específica para qPCR, seguido de 13 µL do mix, que inclui: 0,2 µL de primer forward, 0,2 µL de primer reverse, 3 µL de 5x HOT FIREPol Eva Green qPCR Supermix (Solis BioDyne #08-36-00001) e 9,6 µL de água. Para garantir a homogeneização, a placa foi centrifugada a 2.000 rpm por um minuto.

A leitura foi realizada em máquina especializada (StepOnePlus™ Real Time PCR System) de acordo com o seguinte ciclo: 95oC por 12 minutos, 95oC por 15 segundos, 60oC por 30 segundos e 72oC por 30 segundos (estas últimas três etapas repetidas por 45 vezes), além da curva de dissociação. A análise inicial foi realizada por meio do programa StepOne Software (v2.3) que é associado a máquina de qPCR. Os resultados foram obtidos em Ct (threshold cycle), que indica o ciclo em que o limiar de detecção da fluorescência da amostra foi alcançado pelo aparelho. Para a realização da análise da expressão do gene alvo, inicialmente os valores de amplificação foram normalizados em relação aos valores do gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase), gerando valores de Ct. Em seguida foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual ΔCt corresponde a diferença entre o valor de Ct da amostra e média de Ct do grupo controle e $\Delta\Delta Ct$ corresponde à diferença do ΔCt da amostra e o ΔCt do calibrador (grupo de referência). A curva de dissociação também foi analisada e indicou a obtenção de apenas um único produto de amplificação, aferindo confiabilidade a leitura. A Tabela 8 indica a sequência de nucleotídeos dos primers utilizados.

]Tabela 7: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR

Gene	Primer Foward	Primer Reverse
ZO-1	CCA GCT TAT GAA AGG GTT GTT C	TCC TCT CTT GCC AAC TTT TCT C
Ocludina	ATG TCC GGC CGA TGC TCT C	TTT GGC TGC TCT TGG GTC TGT AT
IL-33	ATTTCCCGGCAAAGTTCAG	AACGGAGTCTCATGCAGTA GA
TSLP	ACGGATGGGGCTAACTTAC AA	AGTCCTCGATTTGCTCGAAC T
IL-4	GGTCTCAACCCCCAGCTAGT	GCCGATGATCTCTCTCAAGT GAT
IL-13	CCTGGCTCTTGCTTGCCTT	GGTCTTGTGTGATGTTGCTC A
IL-22	ATGAGTTTTTCCCTTATGGG GAC	GCTGGAAGTTGGACACCTC AA
IL-23	ATGCTGGATTGCAGAGCAG TA	ACGGGGCACATTATTTTTAG TCT
IL-6	TAGTCCTTCCTACCCCAATT TCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTT C
IL-17 ^a	TTTAACTCCCTTGGCGCAAA A	CTTTCCCTCCGCATTGACAC
TGF	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATC TG
TNF	CCCTCACACTCAGATCATCT TCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATT TG	

3.8 Teste de permeabilidade intestinal

A permeabilidade intestinal foi determinada pela mensuração da radioatividade difundida no sangue após administração de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) com tecnécio ^{99m}Tc (Viana et al., 2010). Após 3 ou 7 dias da indução da mucosite, todos os camundongos receberam 0,1mL da solução de DTPA conjugada com 18,5 mebequerel (MBq) de ^{99m}Tc , por gavagem. Quatro horas depois, todos os animais foram anestesiados para coleta de 300 μL de sangue em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que foram acondicionados em tubos apropriados para determinação de radioatividade. Os dados são obtidos em % de dose, utilizando a seguinte equação: $\% \text{Dose} = (\text{cpm de sangue} / \text{cpm da dose administrada}) \times 100$; onde cpm representa contagens por minuto.

3.9 Análise estatística

As medidas realizadas foram comparadas, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de Tukey para calcular a significância entre os grupos. O Teste t de Student foi também utilizado para comparações entre dois grupos experimentais. Foi considerado diferente aqueles grupos cujo valor de p calculado foi menor que 0,05.

4 Resultados

4.1 O tratamento com Doxorrubicina causa perda de peso, aumento da permeabilidade intestinal e induz alterações na arquitetura do intestino com ulcerações compatíveis com mucosite

Para estudar a evolução da imunopatobiologia da mucosite, desenvolvemos um protocolo com dois time points de sacrifício. Camundongos BALB/cfêmeas com idade de 6-8 semanas foram inoculados i.p. com Doxo (10mg/Kg) e após 3 e 7 dias os animais foram eutanasiados.

Após a administração de Doxo os camundongos foram pesados diariamente. Os animais acometidos pela mucosite apresentaram intensa perda de peso até o sétimo dia da mucosite, apresentando alguma recuperação a partir do nono dia. (Figura 12A). Não observamos encurtamento ou alongamento do intestino delgado dos animais acometidos pela mucosite em relação ao grupo sham, nem sangue visível nas fezes ou diarreia.

A perda da monocamada epitelial do intestino gerada por quimio e radioterápicos gera aumento da permeabilidade intestinal. Logo, nosso próximo passo foi averiguar quais os efeitos da administração de Doxo neste parâmetro. Para tanto, administramos o complexo DTPA99mTcpor gavagem e, após quatro horas, o sangue foi coletado a fim de determinar a radioatividade presente no mesmo. Observamos que no terceiro dia de mucosite a permeabilidade intestinal dos animais está aumentada, mas retorna ao nível do grupo normal, no sétimo dia (Figura 12B).

Paralelo ao aumento da permeabilidade intestinal, analisamos também a expressão de RNA para duas tight junctions muito importantes para a integridade do epitélio no intestino delgado: ZO-1 e ocludina. Assim como na histologia e permeabilidade intestinal, no terceiro dia de mucosite a expressão destas tight junctions está aumentada nos animais acometidos pela mucosite, com aumento significativo no sétimo dia (Figura 12C e D).

A Figura 12G representa a arquitetura da mucosa de camundongos normais (tratados com PBS 1x i.p.). Observamos que a arquitetura da mucosa se encontra intacta, a monocamada de células epiteliais está preservada sem ulcerações, bem como altura de vilo e profundidade de cripta. Abaixo da camada epitelial, observamos a lâmina própria

– GALT. Na porção distal do íleo encontra-se a camada muscular que envolve o intestino.

Observamos à histopatologia que o tratamento com Doxo causa lesões multifocais com perda da camada epitelial apresentando áreas de destruição e encurtamento de vilosidades, encurtamento da profundidade da cripta ulcerações (Figura 12H) especialmente no terceiro dia após o tratamento. No sétimo dia de mucosite a camada epitelial já está reestabelecida e altura de vilo e profundidade de cripta retornaram ao nível do grupo sham (Figura 12I).

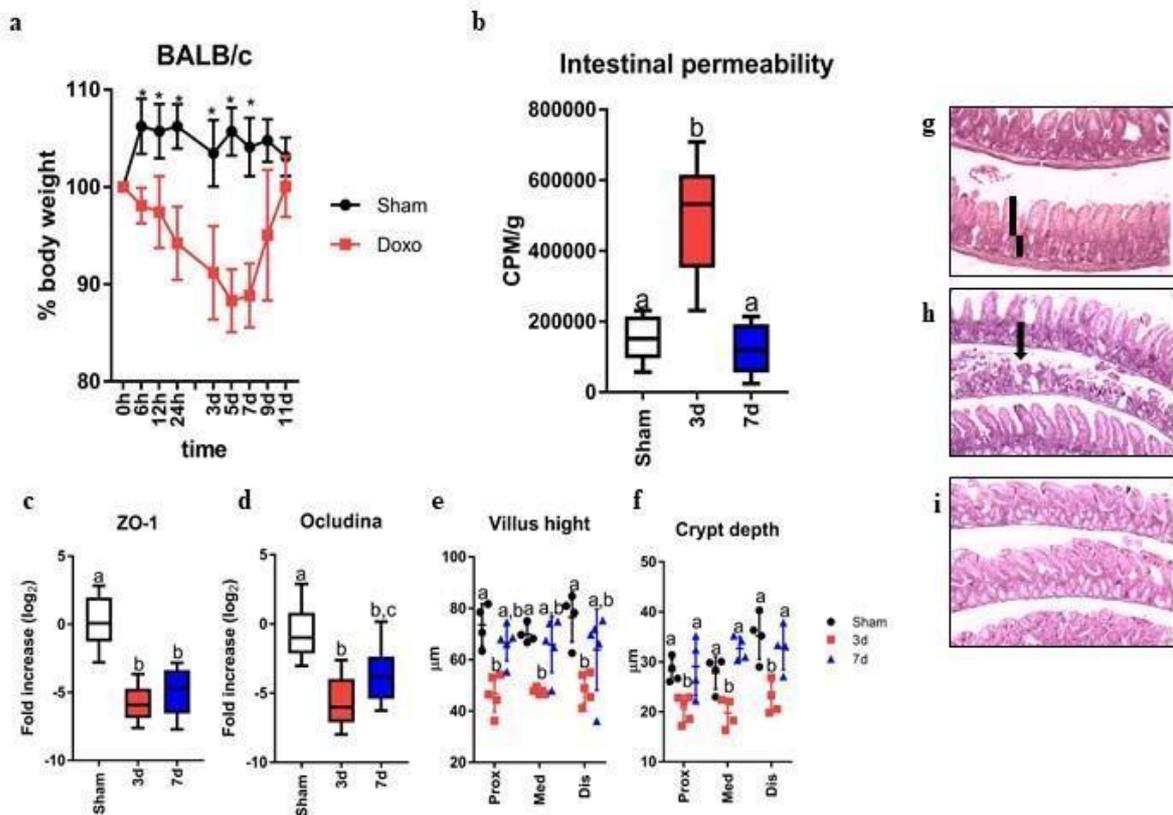


Figura 11: Mucosite experimental em camundongos BALB/c. (A) Variação de peso dos animais durante os 7 dias de acompanhamento. Os animais foram divididos em dois grupos, Naïve (PBS 1x i.p.) e Doxo (10mg/Kg). Cada animal foi pesado diariamente, onde a primeira pesagem foi realizada no primeiro dia do protocolo, e a média de peso por grupo analisada. (B) Permeabilidade intestinal. A permeabilidade intestinal foi determinada pela mensuração da radioatividade difundida no sangue dos camundongos após 4 horas da administração de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) com tecnécio 99m (99mTc). (C, D) Expressão de ZO-1 e Occludina. A expressão das tight junctions ZO-1 e Occludina no íleo foram feitas por qPCR. (E, F) Profundidade de cripta e Altura o vilos. Foi utilizado o software AxionVision para quantificar o tamanho dos vilos e das criptas dos camundongos dos respectivos grupos. (G, H, I) Histologia do íleo Sham, 3 e 7 dias pós mucosite. No corte representado pela letra G observamos a arquitetura normal do íleo, com criptas com profundidade (linha preta – porção inferior) e altura de vilos (linha preta – porção superior) dentro dos padrões de normalidade, com a monocamada de células epiteliais intacta. Em H temos um corte representativo do terceiro dia após o tratamento com Doxo, observamos uma área de ulceração (indicado pela seta preta) – perda da camada epitelial intestinal- evento característico da mucosite, com porções não acometidas pelo efeito colateral. Em I temos um corte representativo do sétimo dia após o tratamento com Doxo. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Letras e símbolos diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2 O tratamento com Doxorrubicina induz morte das células presentes na monocamada epitelial do intestino e interfere na taxa proliferativa

É sabido que a Doxo é uma droga de ação citotóxica inespecífica. Tendo isto em vista, nosso próximo passo foi investigar os padrões de morte celular e proliferação na monocamada epitelial do intestino delgado, foco da mucosite murina, por Citometria de fluxo. Para tanto, extraímos a camada epitelial, como descrito no tópico 4.5, marcamos as células epiteliais (CD326+), as stem cells (Lgr5+) e as T intraepiteliais (CD45+ CD3+). A marcação de morte células se fez com Anexina V e 7AAD, onde apoptose precoce é Anexina V+ 7AAD-, apoptose tardia Anexina V+ 7AA+ e necrose Anexina V- 7AAD+. A taxa proliferativa foi estudada através da marcação do fator de transcrição Ki-67.

Observamos as células epiteliais tem acentuada morte celular, por apoptose, nas primeiras horas após inoculação da Doxo. A partir do terceiro dia até o sétimo, a taxa de necrose se dá muito acentuada nos animais com mucosite, refletindo uma mudança no perfil da morte celular. Entretanto, no sétimo dia já retorna aos níveis do grupo Sham. As stem cells apresentam maior morte celular com seis horas, 5 e 7 dias. Em contra partida, as células T intraepiteliais apresentam aumento progressivo de morte células, por apoptose, tendo pico com 24 horas permanente até o terceiro dia e a partir de então retorna progressivamente aos níveis do grupo Sham, apresentando o mesmo perfil no sétimo dia (Figura 13A).

Ao analisarmos a taxa proliferativa, observamos que as células epiteliais tem queda acentuada apenas no terceiro dia, congruente com o pico da inflamação amplamente descrito na literatura. Em contrapartida, as stem cells tem queda acentuada já nas primeiras seis horas, retorna aos níveis de proliferação ao do grupo Sham e apresenta aumento no quinto e sétimo dia de mucosite (Figura 13A).

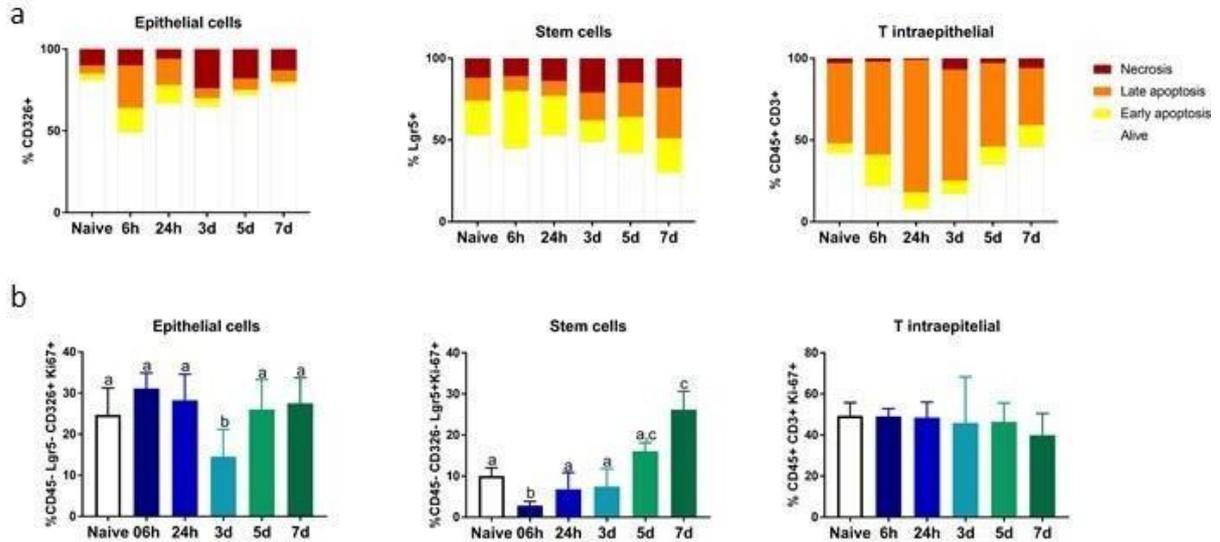


Figura 12: Perfil de morte celular e proliferação das células da camada epitelial intestinal durante a mucosite. Representação gráfica de apoptose precoce (Anexina V+ 7AAD-), apoptose tardia (Anexina V+ 7AAD+) e necrose (Anexina V- 7AAD+), bem como células vivas (Anexina V- 7AAD-). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.3 A mucosite altera o perfil de células da lâmina própria para uma inflamação do tipo 2

A migração de células inflamatórias para tecido em processo de morte celular é um evento comprovado na imunologia. Entretanto, não há trabalhos que descrevam com detalhes a quais células se direcionam ao sítio inflamatório da mucosite, nem sua dinâmica. Neste contexto realizamos análises de citometria de fluxo, com o intuito de caracterizar as populações de células residentes na lâmina própria de camundongos com mucosite. Tendo em vista que a mucosite é um processo inflamatório agudo, investigamos as populações celulares em tempos precoces (6 e 24 horas), no pico da inflamação (3 dias) e na resolução (5 e 7 dias).

Observamos aumento de eosinófilos (CD11b+ SinglecF+) progressivo já nas primeiras

24 horas pós inoculação da Doxo. Neutrófilos (CD11b+ Ly6G+) tem um comportamento ondular, onde há um aumento entre as 24 horas e terceiro dia de mucosite, queda no quinto dia e aumento novamente no sétimo. As DC (Ly6G+ CD11c+ IAIE+) tem expressivo aumento nas primeiras seis horas após inoculação de Doxo e seus níveis vão diminuindo até que no quinto dia se encontram equiparáveis ao grupo sham (Figura 14A).

Ao investigarmos as ILCs, observamos que as ILC1 (Lin- CD56- CD45+ CD127+ Tbet+) só

apresentam aumento apenas no sétimo dia após inoculação de Doxo. As ILC2 (Lin- CD56- CD45+ CD127+ GATA3+) apresentam-se aumentadas de forma significativa a partir do terceiro dia de mucosite. Apesar de observarmos uma tendência de aumento já nas primeiras 24 horas, não há diferença estatística entre os grupos. As ILC3 (Lin- CD56- Cd45+ CD127+ ROR γ t+), por outro lado, aumentam apenas no quinto e sétimo dia de mucosite (Figura 14B).

As células T apresentaram pouca diferença entre os tempos investigados. Os resultados mais proeminentes foram diminuição de Th1 com 24 horas, diminuição de Th2 no sétimo dia e sutil aumento de Th17 no terceiro dia de mucosite (Figura 14C).

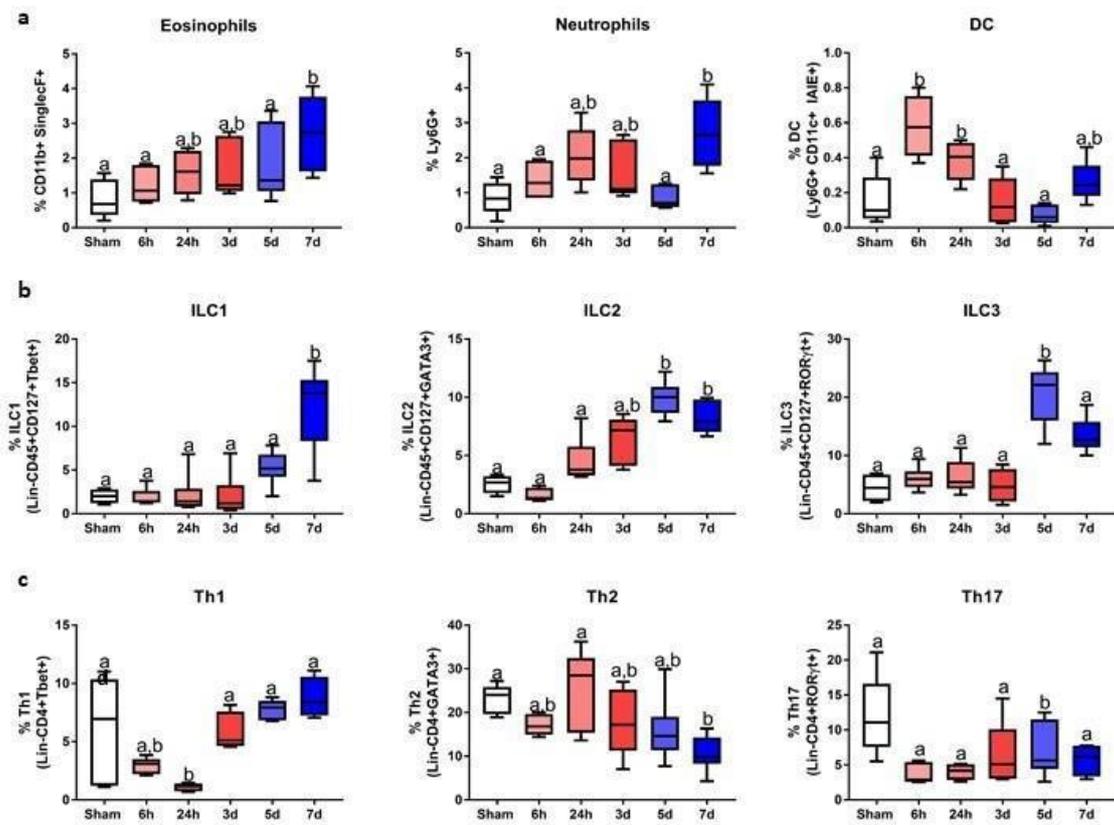


Figura 13: Perfil de células imunes inatas da lâmina própria no decorrer da mucosite. Representação gráfica da imunofenotipagem por citometria de fluxo de (A) eosinófilos (CD11b+ SinglecF+), neutrófilos (CD11b+ Ly6G+), Células Dendríticas (Ly6G+CD11c+IAIE+) respectivamente da lâmina própria do intestino delgado. (B) ILC1 (Lin- Tbet-), ILC2 (Lin- GATA3+) e ILC3 (Lin- ROR γ t+) (C) Th1 (CD3+ CD4+ Tbet+), Th2 (CD3+ CD4+ GATA3+), Th17 CD3+ CD4+ ROR γ t+). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

4.3 A Doxorrubicina induz expressão de citocinas do tipo 2

Realizamos análise do perfil de expressão de citocinas no íleo de camundongos acometidos ou não pela mucosite, por qPCR. Quanto às alarminas, que poderiam estimular uma resposta associada a ILC2, IL-33 não apresentou diferença em sua expressão (Figura 15A), já IL-25 apresentou picos com seis horas, três e sete dias de mucosite (Figura 15B). TSLP apresenta aumento com seis horas, diminuição no terceiro dia e ligeiro aumento no quinto retornando aos níveis do grupo Sham no sétimo dia (Figura 15C).

Ao investigarmos as citocinas, percebemos que IL-22 aumenta os níveis de expressão nas primeiras seis horas, retorna para os níveis do Sham com 24 horas, no terceiro dia tem queda acentuada, mas retorna novamente aos níveis do grupo Sham no sétimo dia (Figura 15D). A IL-4 tem expressão diminuída com seis horas, mas parece buscar o retorno aos níveis fisiológicos entre 24 horas e cinco dias, mas retorna aos níveis do grupo Sham no sétimo dia de mucosite (Figura 15E). A IL-5 encontra-se diminuída com seis e 24 horas, aumenta a expressão com três dias e retorna para os níveis do grupo Sham a partir do quinto dia de mucosite (Figura 15F). A IL-9 tem queda proeminente nas primeiras seis horas que se mantém com 24 horas, mas a partir do terceiro dia retorna aos níveis do grupo Sham (Figura 15G). A Anfirregulina tem sutil queda nas primeiras horas da mucosite, queda no terceiro dia e retorna aos níveis do grupo Sham já no terceiro dia (Figura 15H).

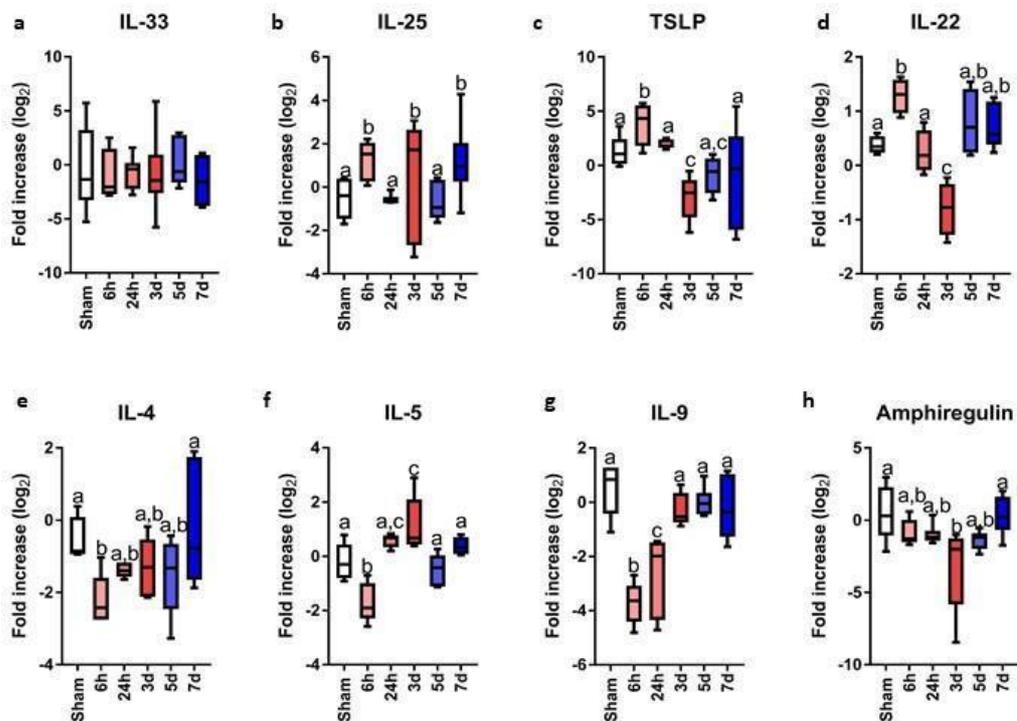


Figura 14: Expressão de citocinas no decorrer da mucosite. O íleo dos camundongos dos grupos Naïve, Doxo 3dias e Doxo 7dias foram retirados, pesados, homogeneizados em trizol para retirada de mRNAs e convertidos em

cDNA. IL-33 (A), IL-25 (B), TSLP (C) IL-22 (D), IL-4 (E), IL-5 (F), IL-9 (G), Anfirregulina (H) foram quantificados por qPCR. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Símbolos diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.4 Neutrófilos tem papel secundário no desenvolvimento da mucosite

A fim de investigar o papel dos neutrófilos na patobiologia da mucosite, utilizamos dois modelos: um inibidor alostérico, não competitivo, para CXCR1/2, que impede a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório e anti-Ly6G (1A8), um anticorpo que depleta os neutrófilos circulantes. Utilizamos camundongos C57BL/6 fêmeas, entre 6-8 semanas, e os submetemos ao seguinte delineamento experimental: os animais foram tratados com DF 2162 i.p. (45mg/Kg) nos dias -1, 0, 1, 2, 4, 5 e 6; a mucosite foi induzida no dia 0 por administração i.p. de Doxo (10mg/Kg).

Os animais tratados apenas com Doxo apresentaram intensa perda de peso nos dois primeiros dias, retornando ao nível do grupo sham no terceiro dia e decaindo novamente a partir do quarto, sendo esta queda mais expressiva no sexto e sétimo dias. Já camundongos com mucosite e tratados com DF 2162 recuperam o peso no terceiro dia e mantiveram este perfil até o dia 7 (Figura 16B).

Análise do perfil de ILCs na lâmina própria destes animais no terceiro dia de mucosite, demonstram que DF 2162 aumenta substancialmente os níveis de ILC2 no intestino delgado tanto em relação ao grupo sham, quanto ao Doxo 3 dias (Figura 16D). Outra subpopulação que encontra-se aumentada neste grupo, no terceiro dia, são as ILC3 (Figura 16).

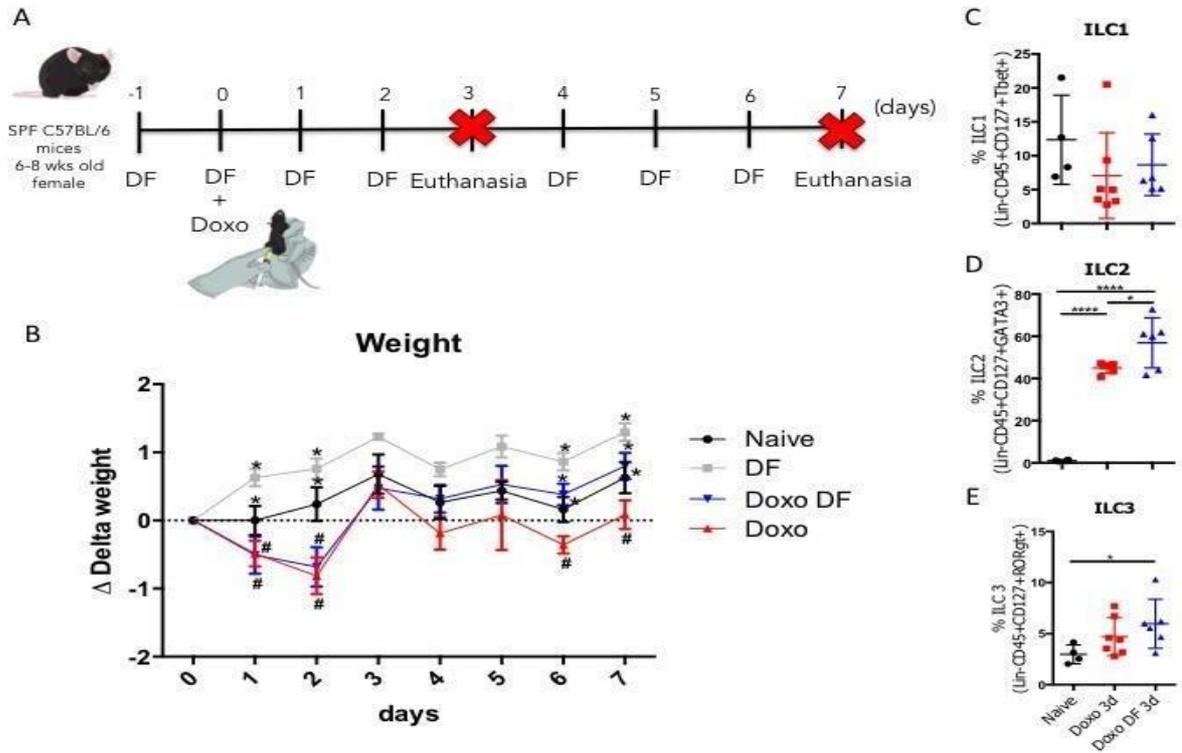


Figura 15: Mucosite experimental em camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com DF2162. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo experimental com duração total de 7 dias, onde nos dias -1, 0, 2, 4, 5 e 6 os animais foram tratados com a droga DF, a mucosite foi induzida no dia 0 por administração i.p. de Doxo (10mg/Kg). A eutanásia se deu em dois tempos: 3 e 7 dias. (B) Variação de peso dos animais durante os 7 dias de acompanhamento. Os animais foram divididos em dois grupos, Naive (PBS 1x i.p.) e Doxo (10mg/Kg). Cada animal foi pesado diariamente, onde a primeira pesagem foi realizada no primeiro dia do protocolo, e a média de peso por grupo analisada. (C, D e E) Imunofenotipagem de ILCs na lâmina própria. Dotplots representativos da porcentagem de ILC1, ILC2 e ILC3, respectivamente. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Símbolos diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Camundongos C57BL/6 (6-8 semanas) fêmeas foram inoculados i.p. com Doxo (10mg/Kg) no dia 0 e com anti-Ly6g i.p. nos dias -2, 0, 1, 4 e 6, e após 3 e 7 dias de mucosite os mesmos foram eutanasiado. Observamos na Figura 17A, que o tratamento com 1A8 não foi capaz de reverter o quadro de perda de peso durante a mucosite. Na Figura 17B, temos a representação gráfica da contagem de neutrófilos no esfregaço sanguíneo e onde fica claro que este anticorpo é capaz de diminuir significativamente o número sistêmico de neutrófilos. A figura 17C traz os dados de permeabilidade intestinal, onde o tratamento com 1A8 traz ligeira melhora deste parâmetro apenas no sétimo dia, mas apresenta o mesmo fenótipo com três dias, ponto mais agudo da mucosite, quando analisamos a permeabilidade intestinal, observamos que o tratamento não traz uma melhora significativa deste parâmetro. A análise da qualidade do infiltrado inflamatório, analisado por citometria de fluxo, da lâmina própria neste contexto (Figura 17 E, F, G, H, I) revela acentuada queda na presença de neutrófilos no intestino, quando comparado com animais que não foram submetidos ao tratamento com 1A8. Ao analisarmos o perfil de eosinófilos, percebemos animais inoculados com 1A8 tem alta frequência desta célula no terceiro dia de mucosite. Análise das ILCs revelaram que o tratamento com anti-Ly6G

aumenta os níveis de ILC1 e ILC3, mas não altera as proporções de ILC2. Cortes histológicos (Figura 17 J, K, L, M, N e O) demonstram que a depleção de neutrófilos traz ligeira melhora na arquitetura do intestino, evitando um encurtamento tão expressivo das vilosidades.

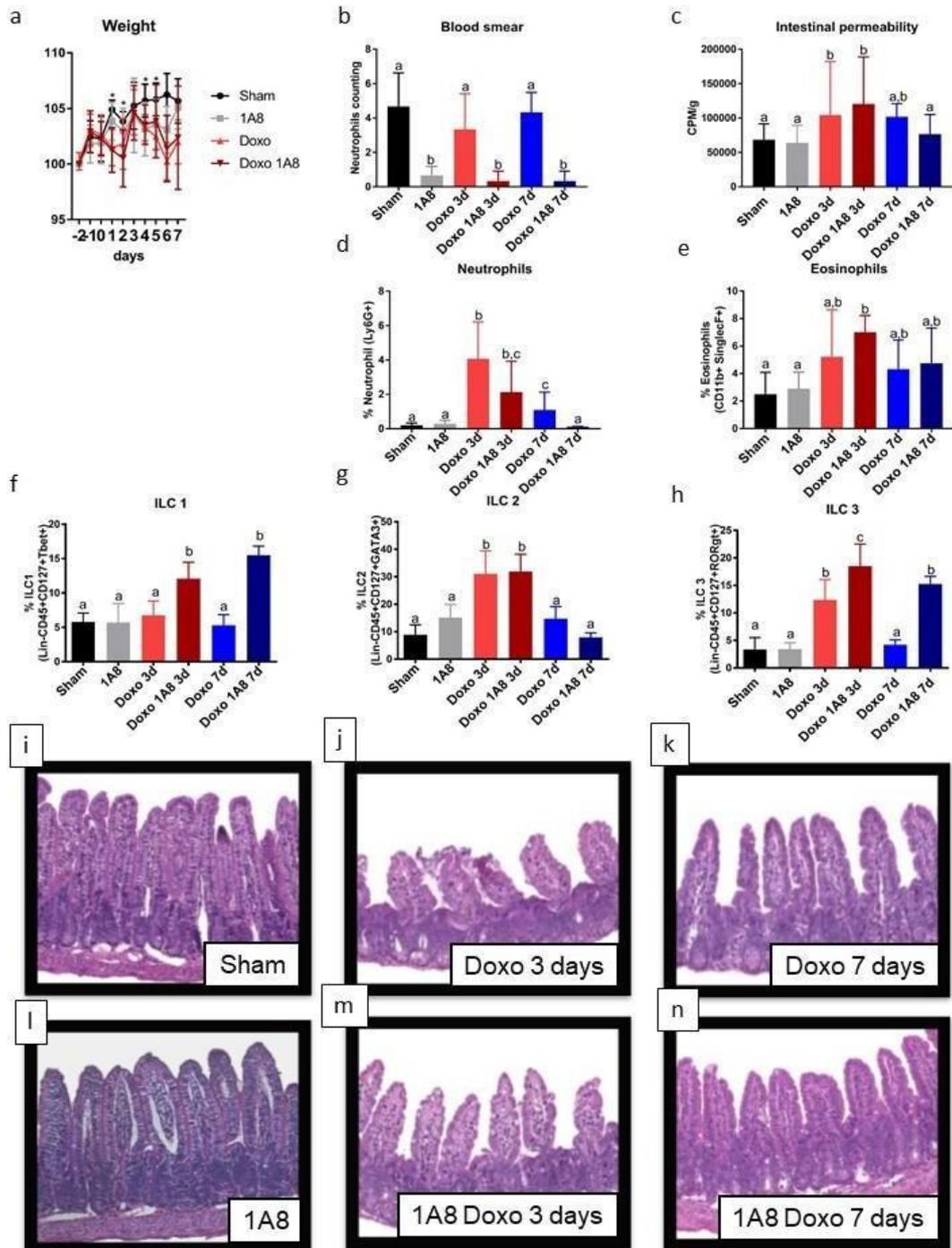


Figura 16: Mucosite experimental em camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com 1A8. Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo experimental com duração total de 7 dias, onde nos dias -2, 0, 1, 4 e 6 os animais foram tratados com 1A8, a mucosite foi induzida no dia 0 por administração i.p. de Doxo (10mg/Kg). A eutanásia se deu em dois tempos: 3 e 7 dias. (A) Variação de peso dos animais durante os 7 dias de acompanhamento. Os animais foram divididos em dois grupos, Naïve (PBS 1x i.p.) e Doxo (10mg/Kg). Cada

animal foi pesado diariamente, onde a primeira pesagem foi realizada no primeiro dia do protocolo, e a média de peso por grupo analisada. (B) Esfregaço sanguíneo. Tratamento com anti-Ly6G causou depleção de neutrófilos em camundongos tratados com o anticorpo. (C) Permeabilidade intestinal. Os animais foram gavados oralmente com DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) marcado com Tecnécio 99m 3 e 7 dias após a indução da mucosite. Quatro horas após a gavagem, o sangue dos camundongos foi coletado em EDTA para determinar a radioatividade. (D, E, F, G, H) Imunofenotipagem na lâmina própria. Gráfico representativos da porcentagem de neutrófilos, eosinófilos, ILC1, ILC2 e ILC3, respectivamente. Histologia representativa mostra melhora mais rápida da arquitetura intestinal em camundongos tratados com 1A8. Íleo dos animais foi coletado para histopatologia. (I) Sham (J) Doxo 3 dias (K) 1A8 Doxo 3 dias (L) 1A8 (M) Doxo 7 dias (N) 1A8 Doxo 7 dias. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Símbolos diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.5 Camundongos deficientes em eosinófilos são protegidos da mucosite induzida por Doxorrubicina

Ao analisarmos o perfil de células imunes na lâmina própria de animais acometidos tratados com Doxo, observamos aumento de eosinófilos a partir do terceiro dia de tratamento, este fato nos levou a investigar o papel desta célula no desenvolvimento da mucosite.

Para tanto, utilizamos camundongos GATA1 KO, deficientes para eosinófilos, inoculamos Doxo (10mg/Kg) i.p., pesamos os animais diariamente e coletamos órgãos para análise no terceiro e sétimo dia de mucosite. Observamos que os camundongos GATA1 KO não apresentaram perda de peso, indicando uma boa resistência aos efeitos da mucosite (Figura 18A). Este fato se reflete também na preservação da permeabilidade intestinal, onde observamos que os animais deficientes para eosinófilos tratados com Doxo apresentam sutil aumento da permeabilidade (Figura 18B), mas muito menor que o grupo selvagem.

A histologia demonstra que o intestino dos animais GATA3 KO, diferentemente de seu WT (BALB/c), não apresenta alterações na arquitetura da mucosa (Figura 18C). Condizente com este fato, estes animais não apresentam alteração na expressão de Ocludina, mas diminuem progressivamente a de ZO-1 (Figura 18D). Ao investigarmos os parâmetros morfométricos, observamos que estes camundongos apresentam, mais uma vez, alterações limiares com diminuição sutil do tamanho das vilosidades apenas no terceiro dia (Figura 18F). A análise da expressão das citocinas não apresentou diferença para o grupo Sham. Esses dados demonstram que os eosinófilos parecem contribuir com a fisiopatologia da mucosite..

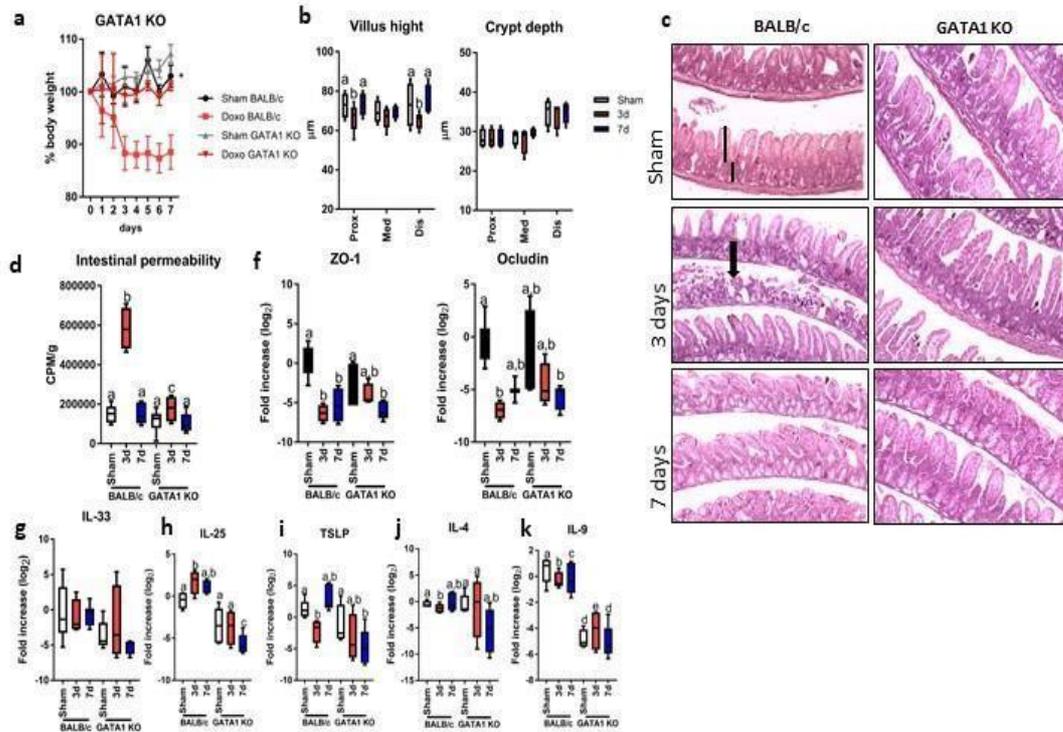


Figura 17: Alterações clínicas, histológicas e de citocinas em camundongos GATA1 KO durante a mucosite. (A) Evolução do peso do GATA1 KO durante a mucosite induzida pela doxorrubicção. (B) Permeabilidade intestinal. A permeabilidade intestinal foi determinada pela mensuração da radioatividade difundida no sangue dos camundongos após 4 horas da administração de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) com tecnécio 99m (99mTc). (C) Histologia do íleo de animais BALB/c e GATA1 KO grupos Sham, 3 e 7 dias pós mucosite. (D) Expressão de tight junctions: A expressão das tight junctions ZO-1 e Occludina no íleo foram feitas por qPCR. (E) Análise da expressão de citocinas IL-33, IL-25, TSLP, IL-4 e IL-9. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Símbolos diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.6 Camundongos *ST2* KO apresentam perfil da mucosite semelhante ao WT

A IL-33 é uma citocina membro da família IL-1 e seu receptor é o ST2. Esta proteína é armazenada no núcleo das células endoteliais e células epiteliais dos tecidos de barreira (Scott et al., 2018). Após o dano celular, a IL-33 é liberada no espaço extracelular e funciona como uma alarmina, que alerta o sistema imunológico da necessidade de criar uma inflamação do tipo 2, desempenhando assim um papel crítico na imunidade inata tipo 2 (Salimi et al., 2013). Tendo em vista que a mucosite se define por uma inflamação que acomete o epitélio oral e gastrointestinal, investigamos o papel do eixo IL-33/ST2 na patologia deste efeito colateral. Neste intuito, utilizamos camundongos *ST2* KO, deficientes para o receptor da IL-33, único mecanismo descrito de ação desta citocina (Gautier et al., 2016), inoculamos Doxo (10mg/Kg) i.p., pesamos os animais diariamente e coletamos órgãos para análise no terceiro e sétimo dia de mucosite.

Observamos que os camundongos ST2 KO apresentaram perda de peso semelhante ao WT (BALB/c) (Figura 19A). Ao investigarmos o perfil da permeabilidade intestinal, percebemos que os animais deficientes para ST2 tem aumento da permeabilidade no terceiro dia de mucosite semelhante ao grupo WT. Entretanto, ao contrário do grupo WT, os camundongos ST2 KO apresentaram um atraso na normalização da permeabilidade, apresentando ainda níveis levemente aumentados no sétimo dia de mucosite (Figura 19B).

A análise dos cortes histológicos reflete o dado de permeabilidade intestinal. Animais WT apresentam áreas de ulceração multifocais no terceiro dia após inoculação da Doxo, mas retornam a morfologia normal do intestino (monocamada epitelial intacta) no sétimo dia. Entretanto, animais com deficiência de sinalização do eixo IL-33/ST2 apresentam ainda algumas áreas de ulceração no sétimo dia de mucosite.

A análise da expressão de tight junctions não revelou alteração de ZO-1, mas apresentou aumento de Ocludina apenas no terceiro dia (Figura 19D). Os parâmetros morfométricos analisados revelaram que no terceiro dia há proeminente encurtamento dos vilos e diminuição da profundidade de cripta que se sustenta ainda no sétimo dia, corroborando com as outras análises realizadas (Figura 19E). Quanto ao perfil de citocinas, verificamos uma diminuição progressiva de IL-4, já IL-9 tem queda acentuada no terceiro dia e uma certa recuperação no sétimo, mas não retorna aos níveis do grupo Sham.

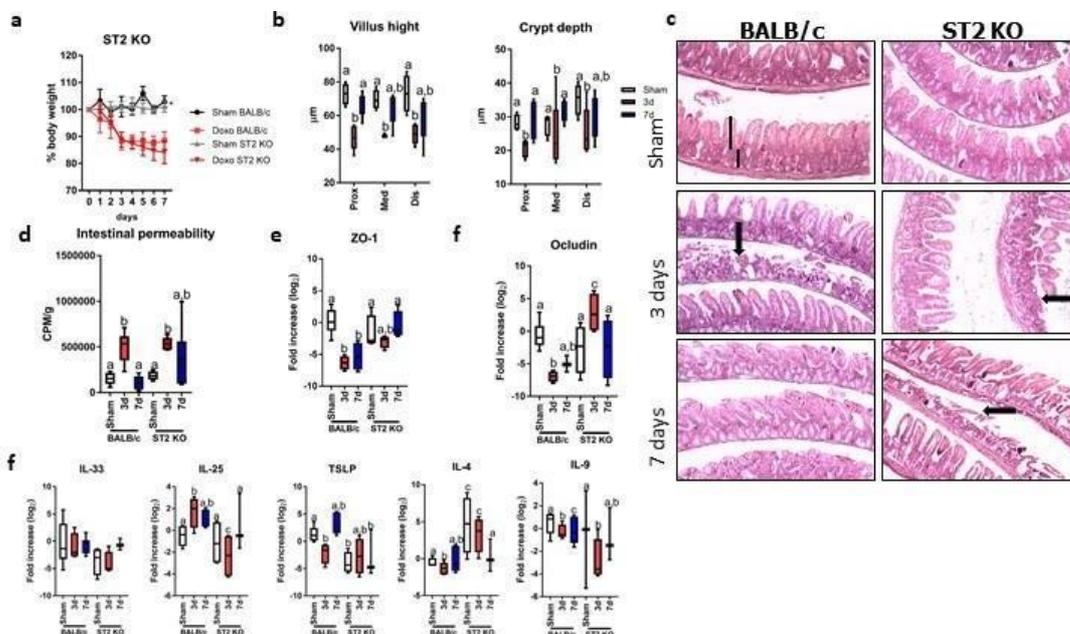


Figura 18: Alterações clínicas, histológicas e de citocinas em camundongos ST2 KO durante a mucosite. (A) Evolução do peso do ST2 KO durante a mucosite induzida pela doxorubicção. (B) Permeabilidade intestinal. A permeabilidade intestinal foi determinada pela mensuração da radioatividade difundida no sangue dos camundongos após 4 horas da administração de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) com tecnécio 99m

(99mTc).(C) Histologia do íleo de animais BALB/c e ST2 KO grupos Sham, 3 e 7 dias pós mucosite. (D) Expressão de tight junctions: A expressão das tight junctions ZO-1 e Ocludinano íleo foram feitas por qPCR.(G) Análise da expressão de citocinas IL-33, IL-25, TSLP, IL-4 e IL-9.A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Símbolos diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.7 Camundongos deficientes em linfócitos T e B apresentam perfil da mucosite semelhante ao WT

Uma vez que a mucosite é pautada por uma resposta do tipo 2, nosso próximo passo foi investigar o papel do sistema imune adquirido na suafisiopatologia. A fim de respondermos esta pergunta, utilizamos camundongos RAG1 KO, que apresentam deficiência em células T e B, inoculamos Doxo (10mg/Kg) i.p., pesamos os animais diariamente e coletamos órgãos para análise no terceiro e sétimo dia de mucosite.

Observamos que os camundongos RAG1 KO tiveram o mesmo perfil de mucosite que o grupo WT (C57BL/6), podemos observar que a evolução do peso se deu de forma similar entre os grupos tratados com Doxo (Figura 14A). A permeabilidade intestinal dos camundongos deficientes para células T e B encontra-se mais elevada que o WT apenas no terceiro dia de mucosite, mas retorna aos níveis do grupo Sham no sétimo, bem como o controle de selvagem.

Os cortes histopatológicos (Figura 20G) demonstram que a evolução da patologia da mucosite ocorreu de forma semelhante entre RAG1 KO e WT (C57BL/6), refletindo o mesmo perfil de altura de vilos e profundidade de cripta (Figura 20D). A análise da expressão das citocinas demonstrou que IL-25 aumenta no sétimo dia durante a mucosite no grupo WT, enquanto que no RAG1 KO não apresenta diferença, já TSLP diminui no KO e não altera no selvagem. Já IL-33, IL-4 e IL-9 não apresentaram diferenças entre selvagens e RAG1 KO (Figura 20H, K, L).

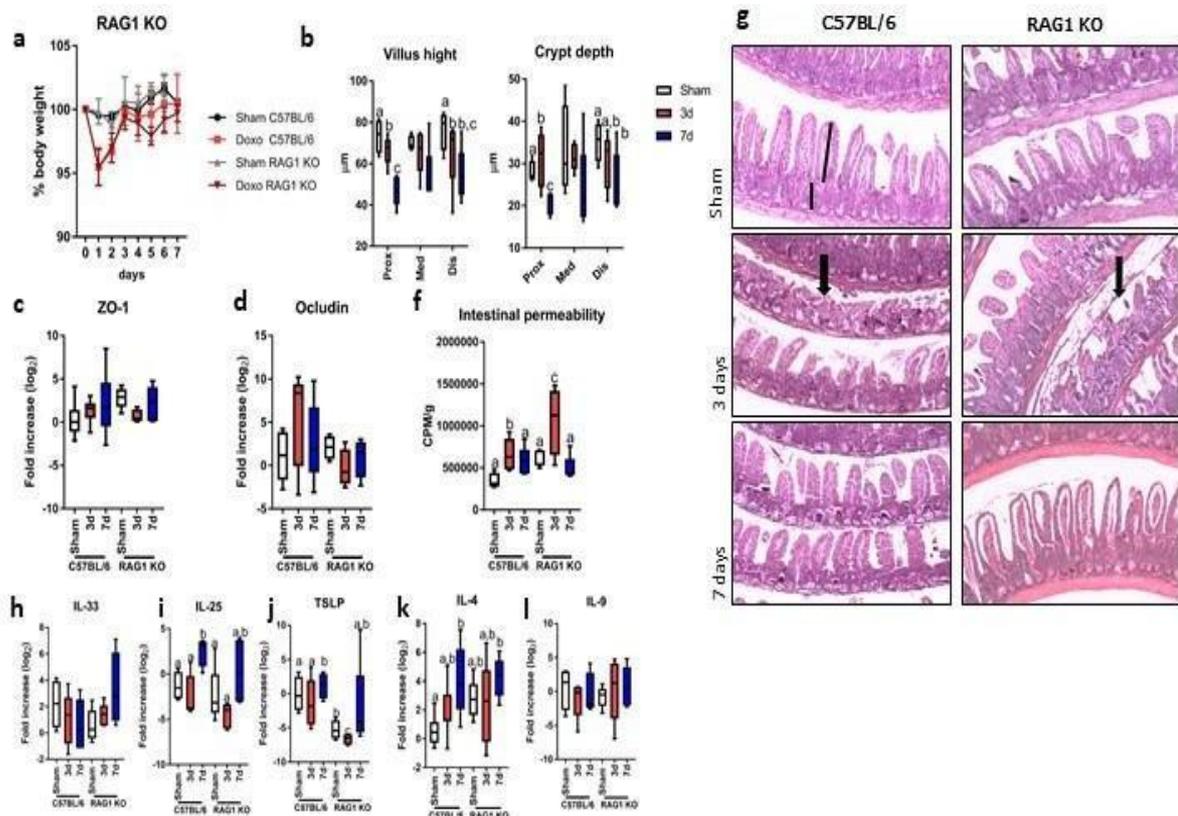


Figura 19: Alterações clínicas, histológicas e de citocinas em camundongos RAG1 KO durante a mucosite. (A) Evolução do peso do RAG1 KO durante a mucosite induzida pela doxorrubicção. (B) Permeabilidade intestinal. A permeabilidade intestinal foi determinada pela mensuração da radioatividade difundida no sangue dos camundongos após 4 horas da administração de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) com tecnécio 99m (99mTc). (C) Histologia do íleo de animais C57BL/6 e RAG1 KO grupos Sham, 3 e 7 dias pós mucosite. (D) Expressão de tight junctions: A expressão das tight junctions ZO-1 e Occludina no íleo foram feitas por qPCR. (E) Análise da expressão de citocinas IL-33, IL-25, TSLP, IL-4 e IL-9. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Símbolos diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4.8 Linfócitos inatos (ILC) são fundamentais para a sobrevivência a mucosite experimental

A análise do perfil da mucosite em camundongos deficientes para células T e B, ou seja, nos RAG1 KO, demonstrou que o sistema imune adquirido tem função marginal na patologia ou resolução desta inflamação. Tendo isto em vista e sabendo da importância da resposta do tipo 2 na mucosite e que recentemente foi descrito uma nova população de células imunes inatas, ILCs, com ação sobreposta às células T, nosso próximo passo foi investigar se há uma relação direta entre a mucosite e as ILCs. Para tanto, utilizamos de camundongos deficientes em Rag1 e na cadeia gama dos receptores de citocinas (que causa deficiência nos receptores de IL2 e IL7), também conhecidos como nod-scid- gamma (NSG) KO. Tais animais têm ausência de células T, B, NK e ILCs. Eles foram inoculados com Doxo (10mg/Kg) i.p., pesados diariamente

e os órgãos foram coletados para análise no terceiro e sétimo dia de mucosite.

Os animais NSG KO demonstraram-se extremamente susceptíveis à mucosite, com intensa perda de peso (Figura 21A) e óbito de 100% dos animais entre o quarto e sétimo dia após inoculação da Doxo (Figura 21B). Cortes histológicos foram realizados no terceiro dia de mucosite e revelam expressivo encurtamento dos vilos e perda da arquitetura das criptas (Figura 21D). Já a análise de permeabilidade intestinal, não revelou diferença entre as linhagens de animais nesse ponto (Figura 21C).

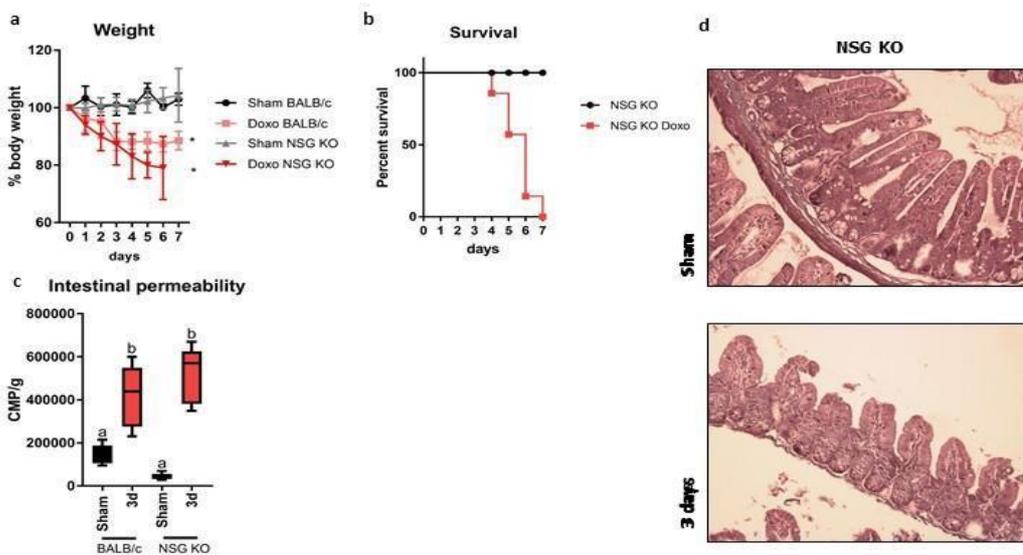


Figura 20: Alterações clínicas e histológicas em camundongos NSG KO durante a mucosite. (A) Evolução do peso do NSG KO e do tipo selvagem BALB / c durante a mucosite induzida pela doxorrubicina. (B) Curva de sobrevivência de camundongos NSG KO tratados e não tratados com doxo. (C) Permeabilidade intestinal de NSG KO e BALB / c 3 e 7 dias após a mucosite do tipo selvagem. (D) Histologia (HE) do íleo representativo do NSG KO Sham e 3 dias pós (10x).

4.9 Transferência adotiva de ILC2 para camundongos NSG KO diminui taxa de mortalidade e mantém monocamada epitelial do intestino

O fenótipo extremamente agressivo da mucosite nos animais NSG KO levantou a hipótese de que as ILC2, as ILCs mais fortemente aumentadas durante a mucosite, seriam de suma importância para a manutenção da integridade do epitélio durante a inflamação aguda causada pela Doxo. A fim de confirmar esta hipótese, realizamos transferência adotiva de células ILC2 para camundongos NSG KO.

O primeiro passo foi induzir mucosite por Doxo (10mg/Kg) em camundongos BALB/c, pois como demonstrado anteriormente, há aumento expressivo desta população no decorrer da mucosite e estas células já estariam primadas em resposta a mucosite. Realizamos a eutanásia destes animais no quinto dia após inoculação da Doxo, onde ocorre o maior pico de ILC2, retiramos o intestino delgado destes animais, extraímos os leucócitos da lâmina própria e fizemos o sorting das células no FACS Aria II. As ILC2 foram, então, inoculadas, na veia caudal, dos animais NSG KO, 24 horas depois a mucosite foi induzida com Doxo (10mg/Kg) i.p. Os animais foram pesados diariamente e os órgãos foram coletados para análise post mortem, no caso dos animais NSG KO + Doxo, e no sétimo dia de mucosite, no caso dos NSG KO + ILC2 + Doxo.

Observamos que a transferência adotiva de ILC2 protegeu os camundongos NSG KO da intensa perda de peso (Figura 22A), bem como reduziu significativamente a letalidade nestes animais. Os cortes histológicos revelaram que os animais que NSG KO + Doxo tem perda completa do epitélio intestinal, com grave ulcerações, deixando a lâmina própria completamente exposta. Já os animais NSG KO + ILC2 + Doxo, apesar de apresentarem vilosidades encurtadas, sustentaram a monocamada epitelial (Figura 22C).

Realizamos citometria de fluxo na lâmina própria dos animais a fim de comprovamos a efetividade da transferência adotiva de células, bem como que estas foram capazes de proliferar no intestino dos animais aceptores.

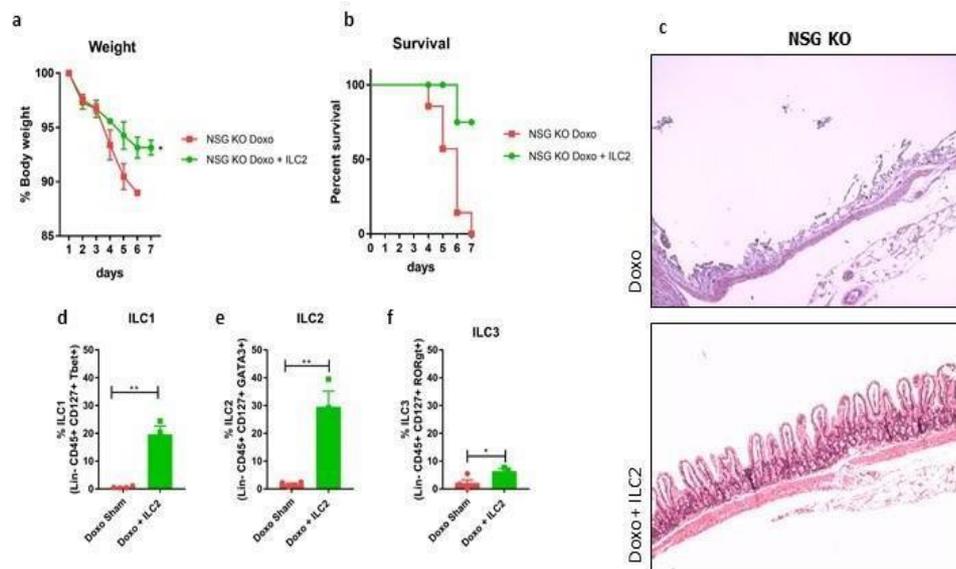


Figura 21: Alterações clínicas e histológicas em camundongos NSG KO com transferência adotiva de ILC2. (A) Evolução do peso de camundongos NSG KO tratados com doxorubicina com ou sem transferência adotiva de ILC2. (B) Curva de sobrevivência de camundongos NSG KO tratados com doxo com ou sem transferência adotiva de ILC2. (C) Histologia (HE) do íleo representativo de camundongos tratados com NSG doxo com ou sem transferência adotiva de ILC2 (10x). (D, E, F) Análise de Citometria de fluxo porcentagens de ILC1, ILC2 e ILC3, respectivamente, na lâmina própria de camundongos NSG KO.

4.10 Pacientes que desenvolvem mucosite tem alteração nas populações de eosinófilos e ILCs

A mucosite é um fator limitante do tratamento com quimioterápicos e ainda hoje existem poucas maneiras de controle e nenhum tratamento efetivo para esta condição, a não ser a suspensão da quimioterapia e a espera pela resolução espontânea do caso. O extremo desconforto para o paciente aliado ao prejuízo ao tratamento configura a mucosite como importante alvo de estudo. Muitos trabalhos são realizados em modelos experimentais, mas ainda não houve um estudo que fizesse um paralelo entre os modelos murinos e o aspecto imunológico dos pacientes. Nosso próximo passo foi averiguar se os dados que encontramos em camundongos refletem a fisiopatologia da mucosite humana.

Em parceria com o Hospital das Clínicas da UFMG, coletamos amostras de sangue de pacientes em tratamento de mieloablação para transplante de medula óssea que desenvolveram sintomas da mucosite. A primeira coleta se deu quando os pacientes começavam a se queixar de desconforto para deglutição, a segunda cinco dias após a primeira coleta e a terceira após o paciente ter se recuperado da mucosite. A fim de entendermos o papel do sistema imune inato no contexto da mucosite, realizamos imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Observamos que no início dos sintomas os pacientes possuem aumento de ILC1 e de eosinófilos, contraposto a uma diminuição de ILC2. No sétimo dia de mucosite o aumento de ILC1 e eosinófilos se mantêm e há também aumento de ILC3 e ILC2 continuam diminuídas em relação aos parâmetros encontrados após a recuperação dos pacientes (Figura 23A).

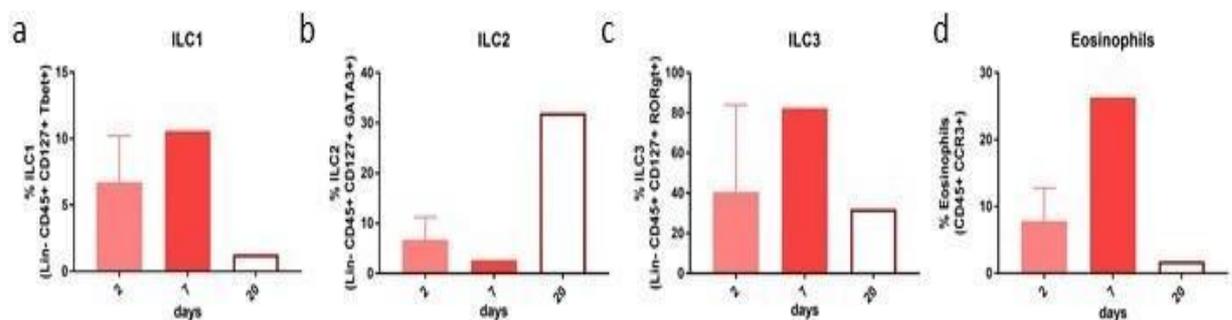


Figura 22: Perfil de células imunes inatas em PBMCs de pacientes no decorrer da mucosite. Representação gráfica da imunofenotipagem por citometria de fluxo de (A) ILC1 (Lin- Tbet-), (B) ILC2 (Lin- GATA3+), (C) ILC3 (Lin- RORgt+) e (D) eosinófilos (CD11b+ SinglecF+). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, para comparação de todos os grupos entre si. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5 Discussão

A mucosite é uma doença marcada pela inflamação e desenvolvimento de úlceras na mucosa de todo o trato gastrintestinal, com aumento da expressão de diversas citocinas e mediadores pró-inflamatórios (Sonis, 1998; Paris et al. 2001; Soares et al. 2012; Kanarek et al. 2014). No modelo murino de mucosite, o órgão mais acometido costuma ser o íleo (Gawish, 2013; Guabiraba et al., 2014). Em pacientes, esse dano à mucosa intestinal pode gerar dor com perda de apetite, diminuição da absorção de nutrientes e conseqüentemente perda de peso (Sonis, 2004; Logan et al., 2008; Al- Dasooqi et al., 2013).

Apesar de haver diversos estudos sobre o processo inflamatório associado a mucosite, até o presente momento, uma investigação detalhada sobre a dinâmica do infiltrado inflamatório não havia sido realizada. Poucos trabalhos avaliaram a participação do sistema imune no desenvolvimento ou resolução desta inflamação (Soares, Maurício, et al., 2013; Soares, Mota, et al., 2013; Guabiraba et al., 2014; Kanarek et al., 2014; Wardill and Bowen, 2018). Mais raros ainda são os estudos da área que investigaram o que ocorre nas primeiras horas após inoculação de quimioterápicos. Acreditamos que nossos dados trazem uma nova perspectiva sobre a organização e participação do sistema imune no contexto da mucosite.

Inicialmente, procuramos estabelecer uma perspectiva geral de parâmetros clínicos e histológicos no modelo experimental da mucosite induzida pela Doxo. Observamos intensa perda de peso, que se inicia já nas primeiras horas após o tratamento, mas com o pior cenário no terceiro dia e recuperação total no nono. A permeabilidade intestinal se encontra elevada no terceiro dia, mas retorna aos níveis normais no sétimo, acompanhado de alteração na expressão de tight junctions. Análises de cortes histológicos demonstraram que a mucosite induzida por Doxo leva a encurtamento dos vilos e diminuição da profundidade de cripta com áreas multifocais de ulceração no terceiro dia. Entretanto, no sétimo dia estes parâmetros são restaurados. Estes dados revelam o quão aguda é a inflamação instaurada durante a mucosite, sugerindo um papel importante do sistema imune inato no controle da morte celular da monocamada epitelial.

Análises de morte celular, por citometria de fluxo, demonstraram intensa morte do epitélio intestinal nas primeiras seis horas após inoculação de Doxo e sutil alteração em stem cells (Figura 12A). Entretanto, as células T intraepiteliais se demonstraram mais susceptíveis a morte celular. Ao investigarmos a proliferação destas subpopulações, observamos intensa diminuição da taxa proliferativa de stem cells nas primeiras seis horas após inoculação de Doxo. As lesões epiteliais causadas pela quimioterapia se dão pelo fato de que os quimioterápicos são drogas citotóxicas, com ação inespecífica, que atingem células de alta taxa proliferativa. O

intestino tem renovação da monocamada epitelial a cada cerca de cinco dias e este processo se dá através da diferenciação de stem cells, localizadas na cripta do intestino (Lgr5+) (Cao et al., 2011). Alguns trabalhos demonstram que a Doxo atinge severamente células Lgr5+ (Dekaney et al., 2009; Cao et al., 2018), o que pode prejudicar a renovação epitelial, contribuindo para ulcerações multifocais correspondentes a mucosite. Células T intraepiteliais estão idealmente posicionadas para realizar a vigilância de monocamada epitelial e ajudar na homeostase e reparo dos tecidos (Nielsen et al., 2018). A alta taxa de morte celular de células T, combinado com as ulcerações na monocamada epitelial, deixam o intestino em processo de mucosite um sítio com alto potencial de infecção. Este dado ajuda a entender o elevado potencial de sepse durante a manifestação da mucosite.

Até o presente momento ainda não há estudos atrelando algum subtipo celular imune ao desenvolvimento ou progressão da mucosite. Investigamos, por citometria de fluxo, a qualidade do infiltrado inflamatório na lâmina própria em diversos tempos após a inoculação da Doxo. Observamos aumento de eosinófilos, neutrófilos e DC (Figura 13A). As células dendríticas são apresentadoras de antígeno profissionais e atuam como sentinelas no corpo, onde ao identificarem um corpo estranho automaticamente se organizam a fim de apresentar antígeno para células T e orquestrar uma resposta imune robusta frente ao antígeno encontrado (Banchereau et al., 2000). Estes antígenos podem ser provenientes da dieta, de patógenos e também células próprias que passaram por processo de morte celular. O aumento das DC nas primeiras horas após inoculação de Doxo pode ser dar devido a intenso aumento de DAMPs (Nace et al., 2012), resultado da intensa morte de células epiteliais neste período.

Neutrófilos, que também encontram-se aumentados até o terceiro dia de mucosite, são tipicamente os primeiros leucócitos a serem recrutados para um local inflamatório e são capazes de eliminar patógenos por três mecanismos distintos: fagocitose, degranulação de proteínas proteolíticas e liberação de NETs (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Esta subpopulação do sistema imune inato é recrutada para o sítio inflamatório através da liberação de quimiocinas, sabe-se que eosinófilos, quando estimulados, produzem altos níveis destas e recrutam grande quantidade de neutrófilos para o sítio inflamatório (Loktionov, 2019). Durante a mucosite, as ulcerações na monocamada epitelial, além de aumentarem a permeabilidade intestinal, também a deixa mais susceptível a translocação epitelial, neutrófilos respondem prontamente a infecções bacterianas e este fato pode explicar o aumento desta população nesta fase inicial da mucosite.

Eosinófilos são leucócitos pró-inflamatórios, que em um estado fisiológico, têm baixa porcentagem circulante no sangue, mas amplamente presentes na lâmina própria do trato gastrointestinal (Hogan, Waddell and Fulkerson, 2013). Observamos um aumento nos níveis desta população já nas primeiras 24 horas de mucosite. Alarminas, citocinas liberadas devido a dano celular, como TSLP, IL-25 e IL-33, promovem eosinofilia, induzindo a produção de IL-

5(Rosenberg, Dyer and Foster, 2012).A ação citotóxica de eosinófilos se dá por degranulação, onde liberam proteínas proteolíticas que geram intenso dano tecidual e exacerbam a inflamação(Gleich, 2000). Seu aumento durante o processo de mucosite, pode estar atrelado a um significativo aumento da translocação bacteriana e também ao aumento das alarminas, devido ao intenso dano tecidual.

Após analisarmos a qualidade do infiltrado inflamatório no contexto da mucosite, nosso próximo passo foi investigar as alterações na expressão de citocinas no intestino no decorrer da inflamação. A mucosite é caracterizada por uma inflamação aguda do trato gastrointestinal, sabe-se que quando há morte celular há a liberação de alarminas no meio extracelular e este sinal é capaz de estimular intensa resposta imune(Rider et al., 2019). Tendo isto em vista, investigamos o perfil de expressão destas moléculas no íleo de animais com mucosite (Figura 10 A, B, C). Observamos aumento significativo das alarminas IL-25 e TSLP, mas não IL-33, como descrito por Guabiraba (2013). O aumento das alarminas é congruente com o estado do tecido epitelial com mucosite, onde ocorre intensa morte do epitélio celular e, portanto, liberação dessas citocinas associadas ao dano. O fato de não termos observado aumento significativo de IL-33 neste contexto pode se explicar pelo fato de investigarmos a expressão desta proteína e não a proteína propriamente dita. Por outro lado, a IL-33 pode não ser relevante na inflamação gerada pela Doxo, mas relevante em outros modelos de mucosite.

A fim de compreendermos os mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite, investigamos também a expressão da IL-22, citocina de papel dúbio podendo participar tanto no contexto inflamatório, quanto de reparo tecidual(Rutz, 2013). Observamos intenso aumento da IL-22 nas primeiras 6 horas após inoculação de Doxo, com queda progressiva entre as 24 horas e 3 dias e voltando a ter ligeiro aumento entre os dias 5 e 7 da mucosite (Figura 14D). No intestino, geralmente, a IL-22 age para fortalecer as funções de barreira epitelial e está envolvida tanto na homeostase dos tecidos como no reparo tecidual e cicatrização(Rutz, 2013). Portanto, podemos especular que o aumento desta citocina a partir do terceiro dia de mucosite possa estar associado ao mecanismo de reparação, ou healing, do epitélio intestinal.

A análise do infiltrado inflamatório revelou intensa presença de células com perfil de resposta do tipo 2, como eosinófilos e ILC2. Portanto, investigamos também a expressão de citocinas do tipo 2. Para nossa surpresa, observamos intensa queda da IL-4 nas primeiras 24 horas após a inoculação de Doxo que retorna aos níveis do grupo sham no sétimo dia (Figura 10E). Tal dado entra em conflito com dados encontrados na literatura, onde animais deficientes para IL-4, tratados com 5-FU, foram protegidos da mucosite (Soares, Mota, et al., 2013).Entretanto, os autores não investigaram a expressão ou a secreção de IL-4 neste contexto inflamatório e segundo a literatura, no contexto de asma alérgica, IL-4 inibe apoptose e promove recrutação de eosinófilos para o sítio inflamatório(J. and L., 2001), além disso ausência de IL-4 também

diminui os níveis de IL-5, o que prejudica a ativação e migração de eosinófilos (Foster et al., 1997). Em contra partida, IL-5 tem extrema queda com seis horas, mas intenso aumento em sua expressão entre 24 horas e 3 dias (Figura 14F). Sabemos que a IL-5 é uma potente citocina ativadora de eosinófilos, esta citocina foi reconhecida como o principal fator de maturação e diferenciação para eosinófilos em camundongos e humanos (Kouro and Takatsu, 2009), portanto o aumento desta citocina corrobora com os altos níveis de eosinófilos no infiltrado inflamatório durante a mucosite.

Baseado no intenso aumento de ILC2 durante o desenvolvimento da mucosite e seu potencial em desenvolver resposta do tipo Th9, investigamos a expressão de IL-9 e anfirregulina (Figura 14 G e H). Observamos intensa diminuição de IL-9 nas primeiras 24 horas após inoculação de Doxo, porém já no terceiro dia há retorno aos níveis do grupo sham. IL-9 é uma citocina pouco estudada, sabe-se de sua participação no desenvolvimento da asma alérgica aumentando a expressão de muco (Erpenbeck et al., 2003), no desenvolvimento de colite ulcerativa, através da sinalização por STAT3/SOCS3 (Tian et al., 2018), mas também possui ação anti-tumoral, animais IL-9 KO apresentaram crescimento acelerado em modelo de melanoma (Purwar et al., 2012). Por outro lado, foi demonstrado que no modelo murino de colite induzida por DSS, que gera intenso dano epitelial, o tratamento com IL-9 é capaz de controlar a inflamação e diminuir significativamente os sintomas da colite (Yuan et al., 2015). Esta citocina também pode atuar como fator de crescimento para mastócitos, linfócitos T e células hematopoiéticas, além disso é capaz de sustentar os níveis de ILC2, promovendo controle de infecção helmíntica pulmonar (Turner et al., 2013). Por outro lado, a expressão de anfirregulina encontra-se diminuída entre as primeiras horas até o quinto dia, mas retorna aos níveis do grupo sham no sétimo. Esta citocina está intimamente atrelada a regeneração tecidual. Sabe-se que esta é capaz de aumentar a expressão de fator de crescimento epidermal (EFG) (Plowman et al., 1990) e polarizar macrófagos para um perfil M2, associado a cicatrização (Patel et al., 2009; Chen et al., 2012). Interessantemente, o ponto de maior queda de anfirregulina coincide com o tempo onde há também perda de peso mais acentuada e maior área de ulcerações da mucosa.

Esta primeira análise de parâmetros imunológicos no decorrer do desenvolvimento da mucosite nos fez investigar mais a fundo a participação de alguns subtipos celulares nesta inflamação: neutrófilos, eosinófilos, T e ILCs. Quando utilizamos o inibidor alostérico DF2162, observamos redução na perda de peso, acompanhado por aumento significativo de ILC2 (Figura 16). ILC2 são capazes de promover healing tecidual quando apresentam perfil do tipo Th9 (Rauber et al., 2017), portanto o efeito protetor da depleção de neutrófilos neste contexto, parece estar mais atrelado ao aumento da frequência de ILC2 do que propriamente a ausência de neutrófilos. Não sabemos se a o DF2162 possui uma atividade de indução de ILC2 intrínseca ou extrínseca, mas o efeito dessa droga na mucosite parece independente da redução de migração de neutrófilos, embora mais estudos sejam necessários para determinar seu efeito. Já o tratamento com 1A8,

anticorpo anti-Ly6G que depleta neutrófilos de forma específica, não foi eficaz para alterar a perda de peso, mas aumentou levemente os níveis de eosinófilos e não alterou os de ILC2. À histopatologia, parece haver uma discreta proteção do epitélio intestinal (Figura 16). Sabe-se que neutrófilos são células de alto potencial de causar dano tecidual e sua ação é capaz de aumentar o processo inflamatório local (Kolaczowska and Kubes, 2013). Portanto, a retirada desta célula do ambiente inflamado por si só pode ser capaz de diminuir o dano tecidual. Visto que a depleção de neutrófilos, bem como o impedimento da migração desta célula, não foi eficaz para o controle da mucosite, concluímos que esta população tem ação marginal na patologia da mucosite.

Os eosinófilos estão intimamente ligados a uma resposta do tipo 2 representam alto potencial de causar dano tecidual através de degranulação, além de secretarem citocinas pró-inflamatórias (Woodruff et al., 2011; Klion, 2017), podendo exacerbar uma inflamação do tipo 2. A fim de investigarmos o papel de eosinófilos na patologia da mucosite, utilizamos camundongos GATA1 KO, deficientes para esta célula (Yu et al., 2002).

Observamos que animais GATA1 KO são refratários a mucosite (Figura 13). Não apresentaram perda de peso, e apenas um aumento discreto da permeabilidade intestinal no terceiro dia de mucosite. À histopatologia, não apresentaram alterações significativas, nem na expressão de citocinas, sejam alarminas ou inflamatórias. Tais resultados indicam que os eosinófilos tem importante função na patologia da mucosite, exacerbando os efeitos citotóxicos da Doxo, aumentando os mediadores locais da inflamação. Estes resultados abrem perspectiva para o desenvolvimento de tratamento para mucosite, por exemplo, utilizando anti-IL-5 a fim de inibir a participação de eosinófilos na mucosite.

O uso de terapias anti-IL-5 tem sido empregada para o tratamento de asma. Por exemplo, a asma severa eosinofílica é uma doença pautada no aumento exacerbado de eosinófilos no pulmão, que geram intensa inflamação. Para tratar esta condição, estão sendo utilizados tratamento com anti-IL-5 e anti-IL-5R (Busse et al., 2018). O uso destes compostos reduz a migração de eosinófilos para o sítio inflamatório e gera intensa melhora no quadro, reduzindo pela metade a taxa de exacerbações da asma nos pacientes, melhorando significativamente o fluxo respiratório (Ha et al., 2017). Estes dados abrem a perspectiva do uso destes medicamentos para o controle da mucosite em pacientes sob tratamento com quimioterápicos.

A IL-33 é uma proteína muito importante, que pode atuar como fator de transcrição, aumentando a produção de citocinas pró inflamatórias, e quando liberadas no meio extracelular atua como alarmina (Matta et al., 2014). O eixo IL-33/ST2 é muito importante na sinalização de eosinófilos (Travers and Rothenberg, 2015), bem como em ILC2 (Mortha and Burrows, 2018). Estas duas células apresentam íntima relação, onde os níveis de IL-5 são mantidos por células ILC2 residentes em tecidos periféricos. Células ILC2 secretam IL-5 constitutivamente

e são induzidas a co-expressarem IL-13 durante a inflamação do tipo 2, resultando em produção localizada de eotaxina e acúmulo de eosinófilos (Nussbaum et al., 2013). A fim de entendermos melhor a participação desta via de sinalização na mucosite, utilizamos camundongos ST2 KO (Cullinan et al., 1998). Observamos que os animais ST2 KO não apresentam diferença na evolução do peso em relação ao WT. Entretanto, mantém a permeabilidade intestinal aumentada ainda no sétimo dia de mucosite, dados de morfometria e os cortes histológicos revelam que estes camundongos apresentam encurtamento de vilo e ulcerações multifocais até o sétimo dia, enquanto que os animais WT neste tempo, já retornaram os parâmetros para os níveis do grupo sham. Sabe-se que as ILC2 residentes ou induzidas, em camundongos ou humanos, expressam ST2 (Walker and McKenzie, 2013). Por esse receptor, a IL33 é capaz de induzir a produção de citocinas do tipo 2, como IL-4 e IL-13, mas também IL-9 (Lu et al., 2015). A via de sinalização IL-33/ST2 na literatura está associada ao aumento da inflamação, como na inflamação hepática onde ela induz o recrutamento de ILC2 que induzem a formação de fibrose (Weiskirchen and Tacke, 2016). Também está envolvida na patogênese da asma alérgica, aumentando eotaxia (Chan et al., 2019) e na progressão de câncer colorretal, aumentando os níveis de Treg ST2+ no tumor, aceleração do crescimento do mesmo (Zhou et al., 2018). Por outro lado, outros estudos apontam um papel anti-inflamatório desta cascata em modelo de colite ulcerativa por TNBS, através da ativação de TLR4 (Wang et al., 2019). Estudo em modelo murino de mucosite, por CPT-11, demonstrou que camundongos ST2 KO são protegidos da mucosite (Guabiraba et al., 2014), possivelmente, segundo os autores, pela redução da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. Entretanto, como demonstramos anteriormente, a retirada de neutrófilos do contexto da mucosite, apesar de diminuir os sinais de inflamação e ter um melhor prognóstico da doença, é uma célula de ação marginal no contexto da mucosite. Por outro lado, Guabiraba et al. não investigaram a dinâmica de eosinófilos neste modelo. A diferença de resultados também pode ser creditada ao modelo, CPT-11 versus Doxo. Dados preliminares de nossos colaboradores sugerem que IL-33 parece ser importante no modelo de mucosite por 5-FU. Desta forma, a participação da sinalização de IL-33/ST2 ainda é pouco entendida, mas nossos dados sugerem que no contexto da mucosite induzida por Doxo, esta via parece ter algum papel na restauração epitelial.

Como a resposta do tipo dois parece ser importante para a mucosite, resolvemos verificar se as células T teriam algum papel nesse processo. Para tanto, utilizamos camundongos RAG1 KO, deficientes para T e B (Mombaerts et al., 1992). Observamos que a ausência de células T e B não altera as manifestações de mucosite, os animais RAG1 KO apresentam o mesmo perfil de perda de peso, a permeabilidade intestinal, apesar de estar mais alta no terceiro dia em relação ao WT, no sétimo retorna aos níveis do sham, não há alteração na expressão de tight junctions, nos parâmetros morfométricos, ou na expressão de citocinas. Podemos concluir com esses dados, que o sistema imune adquirido tem papel marginal no desenvolvimento da mucosite por

Doxo.

Tendo em vista que os linfócitos não participam ativamente da patologia induzida por Doxo, investigamos então a participação dos linfócitos inatos (ILCs). Utilizamos camundongos NSG KO, deficientes para células T, B, NK ou ILC (Shultz et al., 2005; Coughlan et al., 2016). Os animais NSG KO tratados com Doxo apresentaram intensa perda de peso em relação ao WT e 100% de letalidade até o sétimo dia de mucosite, acompanhado intenso aumento da permeabilidade intestinal e diminuição expressiva do tamanho das vilosidades. Este resultado releva que as ILCs são fundamentais para sobrevivência dos camundongos durante a mucosite.

As ILCs são células do sistema imune, que não reconhecem antígenos, em contra partida, esta população responde, prontamente, as alterações das citocinas presentes no meio (Almeida and Belz, 2016). ILC2 expressam GATA3 e portanto montam uma resposta do tipo 2 (Serafini, Vosshenrich and Di Santo, 2015). Entretanto o tipo de citocinas que vão expressar depende dos fatores que a estimularam. Por exemplo, as ILC2 são capazes de expressar citocinas típicas de uma resposta Th9, como a IL-9 (Roediger and Weninger, 2015), se forem estimuladas por IL-25 (Angkasekwina et al., 2017). Esta subpopulação de ILC está envolvida no desenvolvimento de diversas patologias, como obesidade, onde via IL-33 promove o beiging dos adipócitos (Brestoff et al., 2015) e asma, aumentando a expressão de IL-5 e IL-13 levando a um pior prognóstico do quadro (Scanlon and McKenzie, 2012). Entretanto, também há estudos que atrelam as ILC2 na resolução de infecção parasitológica intestinal (Angkasekwina et al., 2017), na resolução e preservação do epitélio respiratório durante a infecção por influenza vírus (Monticelli, 2012), tratamento com IL-33 aumenta os níveis de ILC2 e promove resolução da inflamação do tecido epitelial epidermal (Rak et al., 2016).

Como os animais ST2 KO e NSG KO tiveram uma manifestação da mucosite muito intensa, levantamos a hipótese de que as ILC2 são importantes para o controle da inflamação durante a mucosite induzida por Doxo. Para comprovarmos esta hipótese, purificamos ILC2 utilizando os marcadores de superfície ST2 e CD127, bem como Lin- (NK1.1, CD11c, CD11b, CD3, CD19, Ly6G) para exclusão das demais populações. Transferimos ILC2 para animais NSG KO e depois de 24 horas inoculamos Doxo i.p.. Os animais transferidos apresentaram maior taxa de sobrevivência que os não transferidos. Além disso, cortes histológicos post mortem dos animais não transferidos, revelaram que há perda total da monocamada epitelial nestes camundongos. Em contra partida, animais transferidos com ILC2 tiveram manutenção da monocamada epitelial. Estes dados sugerem que as ILC2 são fundamentais para a integridade do epitélio, especulamos que este fato se dá pela secreção de IL-9 e manutenção dos níveis de anfirregulina. Ambas citocinas aumentam fatores de crescimento importantes para renovação do epitélio neste contexto inflamatório.

Modelos murinos são de fundamental importância para o entendimento das patologias. Entretanto, estes estudos servem como embasamento para posterior aplicação clínica, para tanto é necessário estabelecer uma correlação entre os eventos observados em camundongos e o que ocorre no humano. Neste intuito, em colaboração com o Hospital das clínicas da UFMG, coletamos PBMCs de pacientes que desenvolveram mucosite durante tratamento de ablação para transplante de medula.

Após a extração de leucócitos do sangue, investigamos por citometria de fluxo, a porcentagem de ILCs e eosinófilos. As coletas se deram em três momentos, entre 2-3 dias após início dos sintomas (fase inicial), entre 5-7 dias após o início dos sintomas (pico do quadro clínico) e depois que o paciente se recuperou da mucosite. Nossos dados demonstram que há aumento significativo de eosinófilos, enquanto há diminuição de ILC2 e aumento de ILC3 na fase aguda da mucosite. Este fato corrobora com os dados obtidos em camundongos, onde eosinófilos são importantes para a inflamação e ILC2 tem ação protetora.

6 Conclusão

Nossos dados sugerem que a resposta do tipo 2 desencadeada por eosinófilos está associada a piora da mucosite, em contra partida ILC2 promovem manutenção da monocamada epitelial e healing da mucosa. Neste contexto, abrimos uma nova perspectiva para o entendimento da imunobiologia da mucosite, bem como abrimos precedentes para futuros estudos no que tange o tratamento deste efeito colateral associado a quimioterapia, através da utilização de inibidores de eosinófilos e promotores de ILC2.

7 Referências Bibliográficas

- Al-Dasooqi, N. et al. (2013) ‘Emerging evidence on the pathobiology of mucositis’, *Supportive Care in Cancer*, 21(11), pp. 3233–3241. doi: 10.1007/s00520-013-1900-x.
- Albuquerque, a. C. L., Soares, M. S. M. and Silva, D. F. (2010) ‘Mucosite oral: patobiologia , prevenção e tratamento’, *Com. Ciências Saúde*, 21 (2), pp. 133– 138.
- Almeida, F. F. and Belz, G. T. (2016) ‘Innate lymphoid cells: models of plasticity for immune homeostasis and rapid responsiveness in protection’, *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group, 9(5), pp. 1103–1112. doi: 10.1038/mi.2016.64.
- Angkasekwinai, P. et al. (2017) ‘ILC2s activated by IL-25 promote antigen- specific Th2 and Th9 functions that contribute to the control of *Trichinella spiralis* infection’, *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0184684.
- Artis, D. and Spits, H. (2015) ‘The biology of innate lymphoid cells’, *Nature*, 517(7534), pp. 293–301. doi: 10.1038/nature14189.
- Banchereau, J. et al. (2000) ‘IMMUNOBIOLOGY OF DENDRITIC CELLS’,(Figure 1), pp. 767–811.
- Bodley, A. et al. (1989) ‘DNA Topoisomerase II-mediated Interaction of Doxorubicin and Daunorubicin Congeners with DNA’, *Cancer Research*, 49(21), pp. 5969–5978.
- Bott, R. (2014) *Mucosal Immunology*, Igarss 2014. doi: 10.1007/s13398-014- 0173-7.2.
- Brestoff, J. R. et al. (2015) ‘Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity’, *Nature*. Nature Publishing Group, 519(7542), pp. 242–246. doi: 10.1038/nature14115.
- Busse, W. et al. (2018) ‘Anti – IL-5 treatments in patients with severe asthma by blood eosinophil thresholds : Indirect treatment comparison’, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Inc., 143(1), pp. 190-200.e20. doi: 10.1016/j.jaci.2018.08.031.
- Cao, J. et al. (2018) ‘Selective Targeting and Eradication of LGR5 β Cancer Stem Cells Using RSPO-Conjugated Doxorubicin Liposomes’, pp. 1475–1486. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0694.
- Cao, L. et al. (2011) ‘Intestinal lineage commitment of embryonic stem cells’, *Differentiation*. Elsevier, 81(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.diff.2010.09.182.
- Carvalho, C. R., Verdolin, B. A. and Vaz, N. M. (1997) ‘Indirect effects of oral tolerance cannot be ascribed to bystander suppression.’, *Scandinavian journal of immunology*, 45(3), pp. 276–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9122617>.
- Cassinelli, G. (2016) ‘The roots of modern oncology: From discovery of new antitumor anthracyclines to their clinical use’, *Tumori*, 102(3), pp. 226–235. doi: 10.5301/tj.5000507.

- Chan, B. C. L. et al. (2019) 'IL33 : Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives', 10(March), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2019.00364.
- Chen, F. et al. (2012) 'An essential role for T H 2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 18(2), pp. 262–268. doi: 10.1038/nm.2628.
- Chiappelli, F. (2005) 'The molecular immunology of mucositis: Implications for evidence-based research in alternative and complementary palliative treatments', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2(4), pp. 489–494. doi: 10.1093/ecam/neh129.
- Clevers, H. (2013) 'The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment', *Cell*. Elsevier Inc., 154(2), pp. 274–284. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.004.
- Coughlan, A. M. et al. (2016) 'Myeloid engraftment in humanized mice : impact of GCSF treatment and transgenic mouse strain', pp. 1–42.
- Cullinan, E. B. et al. (1998) 'IL-1 Receptor Accessory Protein Is an Essential Component of the IL-1 Receptor'.
- Cutler, C. et al. (2005) 'Mucositis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A cohort study of methotrexate- and non-methotrexate-containing graft-versus-host disease prophylaxis regimens', *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 11(5), pp. 383–388. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.02.006.
- Cutts, S. M. et al. (2005) 'The power and potential of doxorubicin-DNA adducts', *IUBMB Life*, 57(2), pp. 73–81. doi: 10.1080/15216540500079093.
- Dekaney, C. M. et al. (2009) 'Regeneration of intestinal stem / progenitor cells following doxorubicin treatment of mice', *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, (29), pp. 461–470. doi: 10.1152/ajpgi.90446.2008.
- Denard, B., Lee, C. and Ye, J. (2012) 'Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1', *eLife*, 2012(1), pp. 1–14. doi: 10.7554/eLife.00090.
- Elting, L. S. et al. (2007) 'Risk, Outcomes, and Costs of Radiation-Induced Oral Mucositis Among Patients With Head-and-Neck Malignancies', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 68(4), pp. 1110–1120. doi: 10.1016/j.ijrobp.2007.01.053.
- Engelbertsen, Daniel; Foks, Amanda; Lichtman, A. (2015) 'Expansion of CD25+ Innate Lymphoid Cells Reduces Atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(12), pp. 2526–2535. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306048.Expansion.
- Erpenbeck, V. J. et al. (2003) 'Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes', pp. 1319–1327. doi: 10.1067/mai.2003.1485.
- Faria, Ana M C; Weiner, H. (1999) 'Tolerance: Mechanisms and Therapeutic Applications',

73.

van der Flier, L. G. and Clevers, H. (2009) 'Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium.', *Annual review of physiology*, 71, pp. 241–260. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.

Forchielli, M. L. and Walker, W. A. (2005) 'The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence.', *The British journal of nutrition*, 93 Suppl 1, pp. S41–S48. doi: 10.1079/BJN20041356.

Foster, P. S. et al. (1997) 'Interleukin-4 and Interleukin-5 as Targets for the Inhibition of Eosinophilic Inflammation and Allergic Airways Hyperreactivity', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 SUPPL. 2, pp. 55–61. doi: 10.1590/S0074-02761997000800009.

Gasteiger, G. et al. (2015) 'Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and non-lymphoid organs', *Science*, 350(6263), pp. 981–985. doi: 10.1126/science.aac9593.Tissue.

Gautier, V. et al. (2016) 'Extracellular IL-33 cytokine , but not endogenous nuclear IL-33 , regulates protein expression in endothelial cells', (May), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep34255.

Gleich, G. J. (2000) 'The conquest of allergy Mechanisms of eosinophil- associated inflammation'. doi: 10.1067/mai.2000.105712.

GOTO, S. (2001) 'Doxorubicin-induced DNA intercalation and scavenging by nuclear glutathione S-transferase pi', *The FASEB Journal*, 15(14), pp. 2702– 2714. doi: 10.1096/fj.01-0376com.

Guabiraba, R. et al. (2014) 'IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice.', *Mucosal immunology*. Nature Publishing Group, 7(October 2013), pp. 1–15. doi: 10.1038/mi.2013.124.

Ha, F. et al. (2017) 'Anti-IL5 therapies for asthma (Review) Anti-IL5 therapies for asthma', (9), pp. 3–6. doi: 10.1002/14651858.CD010834.pub3.Copyright.

Hogan, S. P., Waddell, A. and Fulkerson, P. C. (2013) 'Eosinophils in infection and intestinal immunity', pp. 7–14. doi: 10.1097/MOG.0b013e32835ab29a.

J., S. and L., B. (2001) 'Th2 cytokines and asthma Interleukin-4: Its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists', *Respiratory Research*, 2(2), pp. 66–70. doi: 10.1186/rr40.

Kanarek, N. et al. (2014) 'Critical role for IL-1 β in DNA damage-induced mucositis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, pp. E702-11. doi: 10.1073/pnas.1322691111.

Kiessling, R. et al. (1975) "'Natural" killer cells in the mouse II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia Cells. Characteristics', pp. 117– 121.

Klion, A. (2017) 'Recent advances in understanding eosinophil biology [version 1 ; referees :

- 2 approved] Referee Status ’: 6(0), pp. 1–9. doi: 10.12688/f1000research.11133.1.
- Kolaczowska, E. and Kubes, P. (2013) ‘Neutrophil recruitment and function’, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 13(3), pp. 159–175. doi: 10.1038/nri3399.
- Kosiewicz, M. M., Zirnheld, A. L. and Alard, P. (2011) ‘Gut microbiota, immunity, and disease: A complex relationship’, *Frontiers in Microbiology*, 2(SEP), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2011.00180.
- Kouro, T. and Takatsu, K. (2009) ‘IL-5- and eosinophil-mediated inflammation : from discovery to therapy’, 21(12), pp. 1303–1309. doi: 10.1093/intimm/dxp102.
- Ley, R. E., Peterson, D. A. and Gordon, J. I. (2006) ‘Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine’, *Cell*, 124(4), pp. 837– 848. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017.
- Lima-Júnior, R. C. P. (2014) ‘Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis’, pp. 2335–2350. doi: 10.1111/bph.12584.
- Logan, R. M. et al. (2008) ‘Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: Implications for the pathobiology of mucositis’, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 62(1), pp. 33–41. doi: 10.1007/s00280-007-0570-0.
- Loktionov, A. (2019) ‘Eosinophils in the gastrointestinal tract and their role in the pathogenesis of major colorectal disorders’, 9327(27).
- Lu, J. et al. (2015) ‘The role of IL-33 / ST2L signals in the immune cells’, *Immunology Letters*. European Federation of Immunological Societies, 164(1), pp. 11–17. doi: 10.1016/j.imlet.2015.01.008.
- Matta, B. M. et al. (2014) ‘IL-33 Is an Unconventional Alarmin That Stimulates IL-2 Secretion by Dendritic Cells To Selectively Expand IL-33R/ST2+ Regulatory T Cells’, *The Journal of Immunology*, 193(8), pp. 4010–4020. doi: 10.4049/jimmunol.1400481.
- Mebius, R. E., Rennert, P. and Weissman, I. L. (1997) ‘Developing Lymph Nodes Collect CD4⁺ CD3⁺ LT α ⁺ Cells That Can Differentiate to APC , NK Cells , and Follicular Cells but Not T or B Cells’, 7, pp. 493–504.
- Molofsky, A. B. et al. (2013) ‘Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages’, *The Journal of Experimental Medicine*, 210(3), pp. 535–549. doi: 10.1084/jem.20121964.
- Mombaerts, P. et al. (1992) ‘RAG-1-Deficient Mice Have No Mature δ and T Lymphocytes’, 66(D), pp. 869–877.
- Monticelli, L. A. (2012) ‘Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection’, 12(11), pp. 1045–1054. doi: 10.1031/ni.2131.Innate.
- Moro, K. et al. (2010) ‘Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue- associated c-

- Kit+Sca-1+lymphoid cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 463(7280), pp. 540–544. doi: 10.1038/nature08636.
- Mortha, A. and Burrows, K. (2018) 'Cytokine Networks between innate Lymphoid Cells and Myeloid Cells', 9(February). doi: 10.3389/fimmu.2018.00191.
- Nace, G. et al. (2012) 'Immunity Dendritic Cells and Damage-Associated Molecular Patterns : Endogenous Danger Signals Linking Innate and Adaptive Immunity', 2582, pp. 6–15. doi: 10.1159/000334245.
- Neill, D. R. et al. (2010) 'Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity', *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7293), pp. 1367–1370. doi: 10.1038/nature08900.
- Nielsen, M. M. et al. (2018) ' $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues', 17(12), pp. 733–745. doi: 10.1038/nri.2017.101.
- Nonzee, N. J. et al. (2008) 'Evaluating the supportive care costs of severe radiochemotherapy-induced mucositis and pharyngitis results from a northwestern university costs of cancer program pilot study with head and neck and nonsmall cell lung cancer patients who received care at a ', *Cancer*, 113(6), pp. 1446–1452. doi: 10.1002/cncr.23714.
- Nussbaum, J. C. et al. (2013) 'Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis', *Nature*. Nature Publishing Group, 502(7470), pp. 245–248. doi: 10.1038/nature12526.
- Oliphant, C. J. et al. (2014) 'MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4+T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion', *Immunity*. The Authors, 41(2), pp. 283–295. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.016.
- Pang, B. et al. (2013) 'Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 4(May), pp. 1908–1913. doi: 10.1038/ncomms2921.
- Patel, N. et al. (2009) 'Characterisation of effector mechanisms at the host : parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites', *International Journal for Parasitology*. Australian Society for Parasitology Inc., 39(1), pp. 13–21. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.08.003.
- Peterson, D. E., Bensadoun, R.-J. and Roila, F. (2011) 'Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines', *Annals of Oncology*, 22(Supplement 6), pp. vi78–vi84. doi: 10.1093/annonc/mdr391.
- Peterson, L. W. and Artis, D. (2014) 'Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis.', *Nature reviews. Immunology*. Nature Publishing Group, 14(3), pp. 141–53. doi: 10.1038/nri3608.
- Plowman, G. D. et al. (1990) 'The Amphiregulin Gene Encodes a Novel Epidermal Growth Factor- Related Protein with Tumor-Inhibitory Activity', 10(5), pp. 1969–1981.

- Purwar, R. et al. (2012) 'Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9 – producing T cells', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 18(8), pp. 1248–1253. doi: 10.1038/nm.2856.
- Rak, G. D. et al. (2016) 'IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing', *Journal of Investigative Dermatology*. The Authors, 136(2), pp. 487–496. doi: 10.1038/JID.2015.406.
- Rauber, S. et al. (2017) 'Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells', *Nature Medicine*, 23(8), pp. 938–944. doi: 10.1038/nm.4373.
- Rider, P. et al. (2019) 'Alarmins: Feel the Stress'.doi: 10.4049/jimmunol.1601342.
- Roediger, B. and Weninger, W. (2015) *Group 2 Innate Lymphoid Cells in the Regulation of Immune Responses*. 1st edn, *Advances in Immunology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.ai.2014.09.004.
- Rosenberg, H. F., Dyer, K. D. and Foster, P. S. (2012) 'Eosinophils : changing perspectives in health and disease', Nature Publishing Group. Nature Publishing Group, (November). doi: 10.1038/nri3341.
- Rutz, S. (2013) 'IL-22 , not simply a Th17 cytokine', 252, pp. 116–132.
- Salimi, M. et al. (2013) 'A role for IL-25 and IL-33–driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis', *The Journal of Experimental Medicine*, 210(13), pp. 2939–2950. doi: 10.1084/jem.20130351.
- Scanlon, S. T. and McKenzie, A. N. J. (2012) 'Type 2 innate lymphoid cells: New players in asthma and allergy', *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 24(6), pp. 707–712. doi: 10.1016/j.coi.2012.08.009.
- Scollay, R. and Walter, T. (1992) 'Seeding of neonatal lymph nodes by Tcells and identification of a novel population of', pp. 329–334.
- Scott, I. C. et al. (2018) 'Interleukin-33 is activated by allergen- and necrosis- associated proteolytic activities to regulate its alarmin activity during epithelial damage', (October 2017), pp. 1–18. doi: 10.1038/s41598-018-21589-2.
- Serafini, N., Voshenrich, C. A. J. and Di Santo, J. P. (2015) 'Transcriptional regulation of innate lymphoid cell fate', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(7), pp. 415–428. doi: 10.1038/nri3855.
- Shikhagaie, M. M. et al. (2017) 'Innate lymphoid cells in autoimmunity: Emerging regulators in rheumatic diseases', *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group, 13(3), pp. 164–173. doi: 10.1038/nrrheum.2016.218.
- Shultz, L. D. et al. (2005) 'Human Lymphoid and Myeloid Cell Development in NOD/LtSz-

- scid IL2R γ null Mice Engrafted with Mobilized Human Hemopoietic Stem Cells'. doi: 10.4049/jimmunol.174.10.6477.
- Van der Sluis, M. et al. (2006) 'Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection', *Gastroenterology*, 131(1), pp. 117–129. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020.
- Soares, P. M. G., Maurício, J., et al. (2013) 'Cytokine Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4', *Cytokine*. Elsevier Ltd, 61(1), pp. 46–49. doi: 10.1016/j.cyto.2012.10.003.
- Soares, P. M. G., Mota, J. M. S. C., et al. (2013) 'Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4.', *Cytokine*. Elsevier Ltd, 61(1), pp. 46–9. doi: 10.1016/j.cyto.2012.10.003.
- Sonis, S. T. et al. (2004) 'Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients.', *Cancer*, 100(9 Suppl), pp. 1995–2025. doi: 10.1002/cncr.20162.
- Sonis, S. T. (2004) 'The pathobiology of mucositis', *Nature Reviews Cancer*, 4(4), pp. 277–284. doi: 10.1038/nrc1318.
- Spadoni, I. et al. (2015) 'A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria', *Science*, 350(6262), pp. 830–834. doi: 10.1126/science.aad0135.
- Spits, H. et al. (2013) 'Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, (January), pp. 1–5. doi: 10.1038/nri3365.
- Taupin, D. R., Kinoshita, K. and Podolsky, D. K. (2000) 'Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), pp. 799–804. doi: 10.1073/pnas.97.2.799.
- Thorn, C. F. et al. (2011) 'Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects', *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), pp. 440–446. doi: 10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.
- Tian, L. et al. (2018) 'IL-9 promotes the pathogenesis of ulcerative colitis through STAT3 / SOCS3 signaling'. doi: 10.1042/BSR20181521.
- Travers, J. and Rothenberg, M. E. (2015) 'Eosinophils in mucosal immune responses', *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 464–475. doi: 10.1038/mi.2015.2.
- Turner, J. et al. (2013) 'IL-9 – mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation', 210(13), pp. 2951–2965. doi: 10.1084/jem.20130071.
- Umar, S. (2010) 'Intestinal stem cells', *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), pp. 340–348. doi: 10.1007/s11894-010-0130-3.
- Vaz, N. M. and Faria, M. C. De (1993) 'Guia Incompleto de Imunobiologia Imunologia como

se o organismo importasse’.

Velcich, A. (2002) ‘Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2’, *Science*, 295(5560), pp. 1726–1729. doi: 10.1126/science.1069094.

Vivier, E. et al. (2016) ‘The evolution of innate lymphoid cells’, *Nature Immunology*, 17(7), pp. 790–794. doi: 10.1038/ni.3459.

Walker, J. A. and McKenzie, A. N. J. (2013) ‘Development and function of group 2 innate lymphoid cells’, *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd, 25(2), pp. 148–155. doi: 10.1016/j.coi.2013.02.010.

Wang, S. et al. (2017) ‘Article Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation’, *Cell*. Elsevier, 171(1), pp. 201-216.e18. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.027.

Wang, Z. et al. (2019) ‘IL - 33 ameliorates experimental colitis involving regulation of autophagy of macrophages in mice’, *Cell & Bioscience*. BioMed Central, pp. 1–9. doi: 10.1186/s13578-019-0271-5.

Wardill, S. K. H. R. and Bowen, J. M. (2018) ‘Role of toll-like receptor 4 (TLR4) -mediated interleukin-6 (IL-6) production in chemotherapy-induced mucositis’, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 0(0), p. 0. doi: 10.1007/s00280-018-3605-9.

Weiner, H. L. (2011) ‘Oral tolerance’, 241, pp. 241–259. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01017.x.

Weiskirchen, R. and Tacke, F. (2016) ‘Interleukin-33 in the pathogenesis of liver fibrosis : alarming ILC2 and hepatic stellate cells’, *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, 14(2), pp. 143–145. doi: 10.1038/cmi.2016.62.

Woodruff, S. A. et al. (2011) ‘Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases’, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 52(6), pp. 650–661. doi: 10.1097/MPG.0b013e3182128512.

Yu, C. et al. (2002) ‘Targeted Deletion of a High-Affinity GATA-binding Site in the GATA-1 Promoter Leads to Selective Loss of the Eosinophil Lineage In Vivo’, *The Journal of Experimental Medicine*, 195(11), pp. 1387–1395. doi: 10.1084/jem.20020656.

Yuan, A. et al. (2015) ‘IL-9 antibody injection suppresses the inflammation in colitis mice’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.057.

Zhou, Y. et al. (2018) ‘IL-33 Promotes the Development of Colorectal Cancer Through Inducing Tumor-Infiltrating ST2L β Regulatory T Cells in Mice’, 17, pp. 1–11. doi: 10.1177/1533033818780091.