

# **PAPEL DA SEPSE NA INICIAÇÃO E PROMOÇÃO DE CÂNCER COLORRETAL ASSOCIADO À COLITE**

**CAIO ABNER VITORINO GONÇALVES LEITE**

**Tese apresentada à Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará, para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*), Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima**

**Co-Orientador: Prof. Roberto César Pereira Lima Junior**

**São Paulo**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Leite, Caio Abner Vitorino Gonçalves

**Papel da sepse na iniciação e promoção de câncer colorretal associado à colite** / Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite – São Paulo; 2016.

140p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia-ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional(DINTER) Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (in memoriam), Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Descritores: 1. NEOPLASIAS COLORRETAIS. 2. SEPSE. 3. LINFÓCITOS T REGULADORES. 4. MACRÓFAGOS. 5. COLITE. 6. MODELOS ANIMAIS

“Aparelhei o barco da ilusão  
E reforcei a fé de marinheiro.  
Era longe o meu sonho, e traiçoeiro  
O mar...  
(Só nos é concedida  
Esta vida  
Que temos;  
E é nela que é preciso  
Procurar  
O velho paraíso  
Que perdemos).  
Prestes, larguei a vela  
E disse adeus ao cais, à paz tolhida.  
Desmedida,  
A revolta imensidão  
Transforma dia a dia a embarcação  
Numa errante e alada sepultura...  
Mas corto as ondas sem desanimar.  
Em qualquer aventura,  
O que importa é partir, não é chegar.”  
Miguel Torga

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao querido  
Prof. Ronaldo de Albuquerque  
Ribeiro.

“Não morre aquele  
que deixou na terra  
a melodia de seu cântico  
na música de seus versos”

Cora Coralina

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela graça da vida e por sempre guiar o meu caminho

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro por ter transmitido tudo aquilo que um professor poderia passar para um aluno. Agradeço toda a convivência que me fez acreditar no poder transformador das virtudes do ser humano. Dentre as suas virtudes, o amor, seja pelo próximo ou pelo trabalho é o maior exemplo.

Ao Dr. Fernando de Queiroz Cunha pelo ensinamento científico e filosófico. Agradeço por seu potencial de sempre abrir portas e trazer à luz a possibilidade de sonhar, mesmo em momentos duros.

Ao Dr. Roberto César Pereira Lima Junior pelo exemplo de cientista e professor dedicado, e pela incansável força para ajudar em todas as situações.

Ao Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima pela gentileza em aceitar a orientação do trabalho em andamento, e pelo total apoio no desenrolar do projeto.

Ao Dr. José Maurício Segundo Correia Mota pela amizade e orientação em todas as etapas do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Alves Filho pelo auxílio na interpretação de diversos resultados presentes no trabalho.

À Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami pela ajuda na análise dos resultados patológicos do trabalho.

Ao Kalil Alves de Lima pela contribuição essencial na realização e interpretação de grande parte do trabalho, e pela amizade.

À Marcela Davoli Ferreira, Paula Ramos Viacava e Letícia Almeida Nascimento pelo apoio na realização de grande parte dos experimentos.

Aos Professores da Escola Cearense de Oncologia e da Fundação Antônio Prudente pelas aulas e orientações nos rumos da pesquisa do câncer.

À Escola Cearense de Oncologia e Fundação Antônio Prudente pelo apoio logístico na realização do meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Dor (LID) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP que estiveram ao meu lado nos momentos de trabalho e de descontração. Em especial àqueles que contribuíram mesmo que de forma indireta a este trabalho e que tenho maior apreço, Fernanda Vargas Castanheira, Vanessa de Fátima Borges, Paulo Henrique Melo.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, especialmente a Deysi Viviana Tenazoa Wong pela amizade e apoio.

Ao apoio técnico do LID, Giuliana Bertozi, Ieda Regina dos Santos, Ana Kátia dos Santos, Marco Antônio de Carvalho, Diva Amábil Montanha de Sousa, Tadeu Franco Vieira e Sérgio Roberto Rosa.

Aos colegas de pós-graduação pelo convívio e amizade.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por permitir a realização de toda a experimentação do meu trabalho em suas instalações e prover todos os insumos animais e instrumentais.

À toda a minha família, que sempre esteve do meu lado em minhas escolhas e me deu todo o suporte emocional para conseguir realizar este trabalho.

A todos os meus amigos, que de alguma forma incentivaram o meu trabalho.

À Flávia Viana Santa Cecília, pelo amor e companheirismo que me trouxeram uma nova perspectiva de vida e de trabalho.

## RESUMO

Leite CVG. **Papel da sepse na iniciação e promoção de câncer colorretal associado à colite.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará].

**Introdução:** O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais diagnosticada no mundo. A doença inflamatória intestinal é uma importante causa de CCR com patogênese atrelada à inflamação crônica. A sepse é uma doença grave que modifica a resposta imune do hospedeiro. Objetivou-se estudar se animais sobreviventes à sepse apresentam alteração na iniciação tumoral e crescimento tumoral do CCR. **Material e métodos:** Camundongos C57Bl6 machos foram submetidos ao modelo de ligadura e punção do ceco (CLP), e após 15 dias, os sobreviventes e um grupo controle receberam azoximetano (AOM, 10 mg/kg, i.p.) e 3 ciclos de 5 dias de dextran sulfato de sódio (DSS 2%, *ad libitum*) nos dias 20-25, 40-45, 60-65 pós-CLP. Foi avaliada a colite e o desenvolvimento de tumores por colonoscopia. Foram quantificadas citocinas nos dias 0, 12, 52 e 65 e de células T reguladoras (Treg) nos dias 12 e 65. Dois grupos de animais C57 receberam ciclofosfamida (CYP) (100 mg/kg, i.p.) e dois grupos de animais com expressão do receptor de toxina diftérica (DTX) sob regulação do gene *Foxp3* receberam DTX (0,5 mg/animal, i.p.) antes do protocolo AOM/DSS. Outro grupo de animais, foi submetido posteriormente à CLP após AOM/DSS, bem como um grupo de animais foi injetado células de CCR murino (MC38luc)  $10^5$  células no subcutâneo e outro grupo,  $10^6$  células no baço no 15 dias pós-CLP. **Resultados:** Animais sobreviventes à sepse apresentaram redução da colite, além de menor incidência, número de tumores e carga tumoral que animais controle. Os animais pós-sepse tiveram menor produção de IFN- $\gamma$  nos cólon no dia 12, de IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-17, KC e MIG dias 12 e 65, e IL-33, TGF e GM-CSF no dia 65 quando

comparados a animais controle. Além disso, animais pós-sepse apresentaram maior quantidade de Treg no D15, contudo nos dias 12 e 65 observou-se um aumento significativo dessas células nos animais controle comparado ao pós-sepse. Curiosamente, animais pós-sepse que receberam CYP e DTX apresentaram colite e tumores de maneira semelhante aos animais controle. Por outro lado, camundongos pós-sepse tratados previamente com AOM/DSS apresentaram aumento na carga tumoral 30 dias após a CLP quando comparados aos controles. Além disso, no modelo de tumor subcutâneo e esplênico, foi observado maior crescimento tumoral em animais pós-sepse em comparação aos controles. **Conclusões:** A sepse promove inibição da inflamação intestinal murina e do CCR associado à colite, de maneira dependente de células Treg.



## SUMMARY

Leite CVG. **[Role of sepsis in initiation and promotion of colitis-associated colorectal cancer]**. São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com o Instituto do Câncer do Ceará].

**Introduction:** Colorectal cancer (CRC) is the third most diagnosed neoplasm in the world. Inflammatory bowel disease is an important cause of CRC with pathogenesis linked to chronic inflammation. Sepsis is a life-threatening disease that modify the host immune response. We aimed to study whether sepsis-surviving mice showed alterations of colorectal cancer initiation and tumor progression. **Materials and methods:** C57Bl6 male mice were submitted to cecal ligation and puncture (CLP) model, and after 15 days, sepsis-surviving mice and one control group received azoxymethane (AOM, 10 mg/kg, ip) and dextran sodium sulfate (DSS 2%, ad libitum, 3 cycles of 5 days) on days 20-25, 40-45, 60-65 post-CLP. Colitis and tumor development were evaluated by colonoscopy. Cytokines were quantified on days 0, 12, 52 and 65 by Milliplex and Treg cells on days 12 and 65 by flow cytometry. Two groups of C57 animals received cyclophosphamide (CYP) (100 mg/kg, ip), and two groups of animals expressing diphtheria toxin (DTX) receptor under regulation of Foxp3 received DTX (0.5 mg/animal, ip) before the AOM/DSS protocol. Another animal cohort was submitted to CLP after receiving AOM/DSS, as well as, two other groups were injected with murine CRC cells (MC38luc)  $10^5$  cells subcutaneously or  $10^6$  cells intra-splenically 15 days post-CLP. **Results:** Sepsis-surviving animals showed reduced colitis, besides lower incidence, number of tumors and tumor load than control animals. Sepsis-surviving animals have lower production of IFN- $\gamma$  in the colon on day 12, and of IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-17, KC and MIG on days 12 and 65, in addition to IL-33, TGF and GM-CSF on day 65 than control animals. In

addition, post-sepsis mice had a higher amount of Treg on D15, however on days 12 and 65 a significant increase of these cells occurs in control animals compared to post-sepsis. Interestingly, post-sepsis animals receiving CYP and DTX developed colitis and tumors in a similar pattern as control animals. Conversely, post-sepsis mice previously submitted to AOM/DSS showed an increase in tumor load 30 days after CLP when compared to controls. Furthermore, in the subcutaneous and intra-splenic model, it was observed increased tumor growth in post-sepsis animals when compared to the controls. **Conclusions:** Sepsis promotes inhibition of murine intestinal inflammation and colitis-associated CRC in a Treg dependent manner.

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

<b>Figura 1</b>	Marcos do câncer.....	2
<b>Figura 2</b>	Patogênese do câncer colorretal esporádico .....	5
<b>Figura 3</b>	Patogênese do câncer colorretal inflamatório .....	10
<b>Figura 4</b>	Papel do sistema imune na patogênese do CAC .....	22
<b>Figura 5</b>	Níveis de citocinas e de células imunes após a sepse.....	30
<b>Figura 6</b>	Protocolo de iniciação de câncer colorretal pós-CLP .....	44
<b>Figura 7</b>	Aparelho de colonoscopia em camundongos.....	45
<b>Figura 8</b>	Escores dos tamanhos dos tumores em relação à circunferência do cólon.....	47
<b>Figura 9</b>	Protocolo de iniciação de câncer colorretal pós-sepse com depleção de Treg no início do protocolo de iniciação.....	55
<b>Figura 10</b>	Protocolo de iniciação de câncer colorretal seguido de sepse.....	56
<b>Figura 11</b>	Protocolo de progressão tumoral pós-CLP .....	58
<b>Figura 12</b>	Sobrevida dos animais submetidos ao protocolo de CLP .....	61
<b>Figura 13</b>	Variação temporal do peso durante o protocolo de iniciação tumoral colorretal com AOM/DSS.....	62

<b>Figura 14</b>	Sobrevida dos animais submetidos ao protocolo de iniciação tumoral colorretal com AOM/DSS.....	63
<b>Figura 15</b>	Escores colonoscópicos de classificação de colite durante o protocolo AOM/DSS.....	64
<b>Figura 16</b>	Fotografias representativas com visão endoscópica de cólons de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS.....	65
<b>Figura 17</b>	Média do comprimento dos cólons dos animais submetidos ao protocolo AOM/DSS.....	65
<b>Figura 18</b>	Número de tumores e carga tumoral colonoscópica de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS .....	66
<b>Figura 19</b>	Fotografias representativas com visão endoscópica de cólons de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS.....	67
<b>Figura 20</b>	Porcentagem de animais que desenvolveram tumores colorretais macroscopicamente e quantidade de tumores por animal .....	68
<b>Figura 21</b>	Fotografias representativas com visão macroscópica de cólons de animais submetidos ao protocolo de iniciação tumoral .....	69
<b>Figura 22</b>	Fotomicrografias representativas com visão das camadas do cólon de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS .....	70
<b>Figura 23</b>	Dosagem de IFN- $\gamma$ do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	71
<b>Figura 24</b>	Dosagem de IL-1 $\beta$ do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	72

<b>Figura 25</b>	Dosagem de TNF do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	72
<b>Figura 26</b>	Dosagem de IL-6 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	73
<b>Figura 27</b>	Dosagem de IL-17 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	73
<b>Figura 28</b>	Dosagem de KC do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	74
<b>Figura 29</b>	Dosagem de MIG do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	74
<b>Figura 30</b>	Dosagem de IL-33 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	75
<b>Figura 31</b>	Dosagem de TGF- $\beta$ do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	75
<b>Figura 32</b>	Dosagem de GM-CSF do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	76

<b>Figura 33</b>	Dosagem de IL-23 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0 12, 52 e 65.....	76
<b>Figura 34</b>	Quantidade de citocinas/ml produzidas pelos macrófagos. ....	78
<b>Figura 35</b>	Porcentagem de células F4/80+CD206+ (M2) no total de células .	79
<b>Figura 36</b>	Porcentagem de células CD4+IFN-gama+ (Th1) e CD4+IL-17+ (Th17) no total de células .....	80
<b>Figura 37</b>	Porcentagem de células CD4+Foxp3+ (Treg) total de células mononucleares CD45+ nos cólons (intraepiteliais e lâmina própria)	81
<b>Figura 38</b>	Porcentagem de células CD4+Foxp3+ (Treg) total de células mononucleares CD45+ nos baços e linfonodos mesentéricos .	82
<b>Figura 39</b>	Porcentagem de células CD4+ e CD4+Foxp3+ no total de células mononucleares intraepiteliais dos cólons após um ciclo de DSS.....	84
<b>Figura 40</b>	Porcentagem de células CD4+ e CD4+Foxp3+ no total de células mononucleares na lâmina própria dos cólons após um ciclo de DSS.....	85
<b>Figura 41</b>	Porcentagem de células F4/80+ARG1+ no total de células mononucleares na lâmina própria dos cólons 15 dias após CLP...	86
<b>Figura 42</b>	Sobrevida dos animais WT que receberam ciclofosfamida (A) e DEREQ que receberam toxina diftérica (DTX) (B) e que foram submetidos ao protocolo de iniciação tumoral colorretal com AOM/DSS.....	87

<b>Figura 43</b>	Escores colonoscópicos de colite após tratamento com ciclofosfamida .....	88
<b>Figura 44</b>	Escores colonoscópicos de colite após tratamento de animais DEREK com toxina diftérica .....	89
<b>Figura 45</b>	Número de tumores e da carga tumoral por colonoscopia após tratamento com ciclofosfamida .....	90
<b>Figura 46</b>	Número de tumores e da carga tumoral dos animais DEREK após tratamento com DTX por colonoscopia.....	91
<b>Figura 47</b>	Número de tumores e da carga tumoral por colonoscopia e macroscopia de animais pós-AOM/DSS submetidos à CLP .....	93
<b>Figura 48</b>	Fotografias representativas com visão macroscópica de cólons de animais pós-AOM/DSS submetidos à CLP .....	94
<b>Figura 49</b>	Variação do volume tumoral em mm <sup>3</sup> medido por paquímetro em função do tempo em dias.....	95
<b>Figura 50</b>	Variação do volume tumoral em mm <sup>3</sup> medido por paquímetro em função do tempo em dias de animais controle e pós-sepse.....	96
<b>Figura 51</b>	Crescimento de tumores após inoculação de células tumorais no subcutâneo de animais controle e pós-sepse avaliado bioluminescência.....	97
<b>Figura 52</b>	Fotografia representativa de camundongos durante a medição da bioluminescência no dia 21 de animais injetados com células MC38 no subcutâneo .....	97

<b>Figura 53</b>	Varição do fluxo total (fótons por segundo) medido por bioluminescência em função do tempo em dias de acordo com injeção de quantidades diferentes de células no baço.....	98
<b>Figura 54</b>	Sobrevida dos animais submetidos ao protocolo de colonização esplênica após inoculação com diferentes volumes de células tumorais .....	99
<b>Figura 55</b>	Fluxo total (fótons por segundo) medido por bioluminescência no décimo dia em animais controle e pós CLP injetados com $1,0 \times 10^6$ no baço .....	100
<b>Figura 56</b>	Fotografias representativas de animais submetidos a medição de bioluminescência no décimo dia de animais injetados com células MC38 no baço .....	100
<b>Figura 57</b>	Papel da sepse e das células T reguladoras no desenvolvimento do câncer colorretal associado à colite.....	118
<b>Tabela 1</b>	Análise histopatológica das amostras dos cólons quanto a identificação de malignidade.....	70



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AOM</b>	Azoximetano
<b>AP-1</b>	Proteína de ativação-1
<b>CAC</b>	Câncer colorretal associado à colite
<b>CARS</b>	Resposta compensatória anti-inflamatória
<b>CCHNP</b>	Câncer colorretal hereditário sem polipose
<b>CCR</b>	Câncer colorretal
<b>CIN</b>	Instabilidade cromossômica
<b>CLP</b>	Ligação e punção do ceco
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados ao dano
<b>DC</b>	Doença de Crohn
<b>DCC</b>	Gene <i>Deleted in colorectal cancer</i>
<b>DEREG</b>	Animais com DTR acoplado ao Foxp3
<b>DII</b>	Doença inflamatória intestinal
<b>DPC4</b>	Gene <i>Deleted in pancreatic cancer 4</i>
<b>DSS</b>	Dextran sulfato de sódio
<b>DTR</b>	Receptor de toxina diftérica
<b>DTX</b>	Toxina diftérica
<b>EPCAM</b>	Molécula de adesão de células epiteliais
<b>Foxp3</b>	Fator de transcrição <i>foxhead box 3</i>
<b>GM-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
<b>IEL</b>	Linfócitos intraepiteliais
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1Ra</b>	Antagonista do receptor da interleucina-1
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>IVIS</b>	Sistema de imagem <i>in vivo</i>

<b>LOH</b>	Perda de heterozigose
<b>LP</b>	Lâmina própria
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTC</b>	Linfócito T citotóxico
<b>M-CSF</b>	Fator estimulador de colônias de macrófagos
<b>MHC II</b>	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
<b>MSI</b>	Instabilidade de microssatélites
<b>NET</b>	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
<b>NOD</b>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain receptor</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear κB
<b>PAF</b>	Polipose adenomatosa familiar
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PRR</b>	Receptores de reconhecimento de padrão
<b>RCU</b>	Retocolite ulcerativa
<b>SIRS</b>	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
<b>SOFA</b>	Escores de avaliação sequencial de disfunção de órgãos relacionados a sepse
<b>TAM</b>	Macrófagos associados ao tumor
<b>TAN</b>	Neutrófilos associados ao tumor
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento tumoral-beta
<b>Th</b>	Linfócito T auxiliar
<b>TLR</b>	Receptor do tipo Toll
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>Treg</b>	Célula T reguladora
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	Câncer Colorretal .....	2
1.2	Doença Inflamatória Intestinal .....	12
1.3	Sistema Imune Intestinal e Doença Inflamatória Intestinal .....	14
1.4	Sistema Imune Intestinal e CAC .....	22
1.5	Modelos Experimentais de Câncer Colorretal Associado a Colite .....	25
1.6	Sepse .....	26
1.7	Modelos Experimentais de Sepse e de Imunossupressão .....	32
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
3.1	Objetivo Geral .....	35
3.2	Objetivos Específicos .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
5.1	Animais .....	36
4.2	Drogas .....	37
4.3	Preparo de Soluções e Reagentes .....	38
4.4	Modelos de sepse e imunossupressão pós-sepse .....	42
4.5	Protocolo de indução tumoral em animais pós-sepse .....	43
4.6	Colonoscopia .....	44
4.7	Escores colonoscópicos de colite .....	45
4.8	Avaliação da carga tumoral .....	46
4.9	Dosagem de citocinas .....	47
4.10	Diferenciação de macrófagos provenientes da medula óssea .....	49
4.11	Diferenciação de células dendríticas provenientes da medula óssea .....	51
4.12	Quantificação de linfócitos Treg .....	52
4.13	Protocolo de depleção de células Treg em animais submetidos à	

indução tumoral .....	54
4.14 Protocolo de indução tumoral seguida de sepse .....	56
4.15 Linhagem tumoral .....	56
4.16 Modelo de crescimento tumoral heterotópico em animais pós-sepse	57
4.17 Processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB) ..	59
4.18 Protocolo de colonização esplênica em animais pós-sepse.....	59
4.19 Análise de resultados .....	60
<b>5     RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
5.1 Iniciação tumoral .....	61
5.2 Cultura de células apresentadoras de antígenos .....	77
5.3 Progressão tumoral .....	80
5.4 Experimento de colonização esplênica (metástase).....	98
<b>6     DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>7     CONCLUSÕES .....</b>	<b>119</b>
<b>8     REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>120</b>

## **ANEXOS**

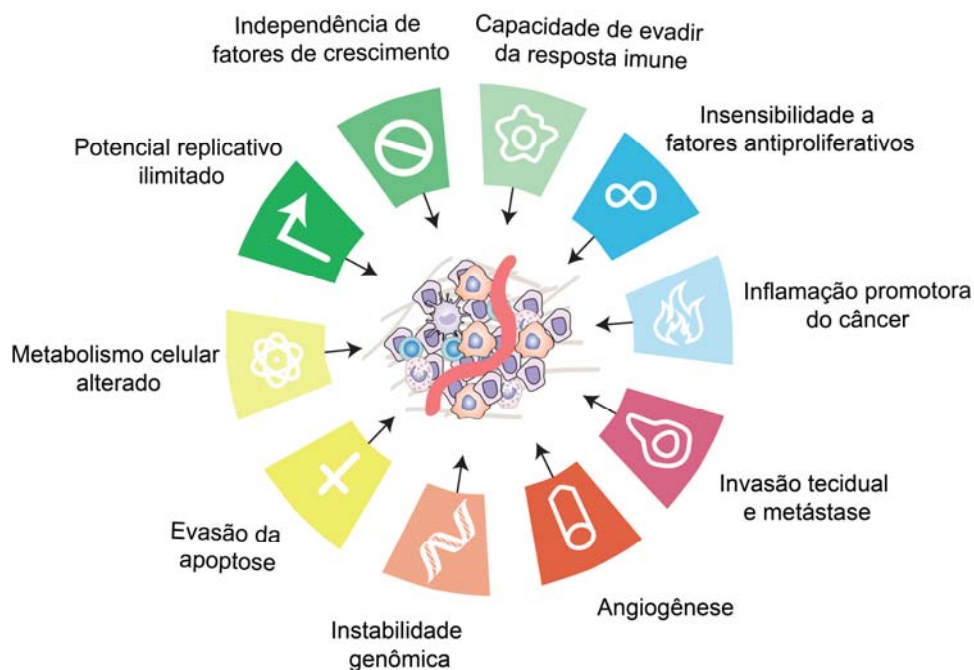
**Anexo 1** Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - FMRP – USP

**Anexo 2** Planejamento experimental com número total de animais utilizados

# 1 INTRODUÇÃO

A etiologia do câncer baseia-se na transformação maligna de células do hospedeiro através da exposição a fatores externos (como o cigarro, dieta e organismos infecciosos) e internos (como mutações genéticas adquiridas, alterações hormonais e condições imunes) (BHATIA e SKLAR 2002). De forma pioneira, WEINBERG (1989) e FEARON e VOGELSTEIN (1990) descreveram que a carcinogênese acontece em múltiplos passos, que podem ser agrupados em iniciação, promoção e progressão tumoral. Cada processo está relacionado a alterações moleculares e genéticas que ativam oncogenes ou desativam genes supressores de tumor (BERG 1989; FEARON e VOGELSTEIN 1990).

Os marcos do câncer são: independência de fatores de crescimento, insensibilidade a fatores antiproliferativos, metabolismo celular alterado, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese, invasão tecidual e metástase, capacidade de evadir da resposta imune, instabilidade genômica e inflamação promotora do câncer (Figura 1) (HANAHAN e WEINBERG 2011), sendo potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas estratégias de combate ao câncer.



**Fonte:** Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2011).

**Figura 1** - Marcos do câncer.

## 1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) representa a terceira neoplasia maligna mundialmente mais diagnosticada em homens e a segunda em mulheres, com incidência de mais de 1,3 milhões de novos casos e quase 700 mil mortes em 2012 (TORRE et al. 2015). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), aproximadamente 34.280 novos casos de CCR serão diagnosticados no Brasil em 2016. Esse número corresponde a cerca de 16 novos casos a cada 100 mil homens e 17 a cada 100.000 mulheres, com uma mortalidade de mais de 15.000 indivíduos por ano em todo o país.

No Ceará a incidência é de 8,92/100.000 pessoas (Ministério da Saúde 2016).

A incidência de CCR pode variar de acordo com a região, assim, países da Oceania (Austrália e Nova Zelândia), Europa e América do Norte possuem as maiores incidências, enquanto países da África ou da Ásia Central têm as menores taxas. Essas diferenças de susceptibilidade são possivelmente atribuídas a diferentes exposições ambientais e dietéticas, a fatores genéticos ou a diferentes estratégias de detecção (TORRE et al. 2015). No Brasil, a maior incidência de casos de CCR concentra-se nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Paraná (Ministério da Saúde 2016).

A idade é um dos fatores de risco mais importantes, uma vez que indivíduos abaixo de 40 anos raramente têm CCR. A incidência cresce significativamente em pessoas com idade entre 40-50 anos, com aumento vertiginoso a cada década de envelhecimento (EDDY 1990). Os fatores de predisposição genética estão presentes nas síndromes familiares, como a polipose adenomatosa familiar e a síndrome de Lynch, contudo, representam apenas 5% de todos os pacientes com CCR (VUKASIN et al. 1990).

A retocolite ulcerativa (RCU) está associada a um aumento no risco de CCR entre 5 a 15 vezes quando comparado a população geral. O aumento da incidência de CCR em pacientes com RCU se inicia 8 a 10 anos após o diagnóstico, atingindo 30% dos pacientes após 40 anos do diagnóstico de RCU (EKBOM et al. 1990).

Outros fatores de risco são cor negra, acromegalia, transplante renal, obesidade, diabetes, consumo de carnes vermelhas e processadas, cigarro e álcool (MACRAE 2016).

Por outro lado, um grande número de fatores tem sido associado à redução do risco de desenvolver CCR. Dentre eles, estão atividade física regular, dieta vegetariana, fibras, amido resistente, ácido fólico, vitamina B6, cálcio, vitamina D, magnésio, consumo de alho e peixe (MACRAE 2016). O uso de anti-inflamatórios não esteroidais, como a aspirina em baixas doses, e os inibidores seletivos de cicloxigenase-2, como o celecoxibe, estão associados à redução de risco de desenvolver CCR (ROTHWELL et al. 2011). Entretanto, não há evidências suficientes para se recomendar o uso de fármacos para prevenção primária do CCR.

Os principais sinais e sintomas de CCR são sangue nas fezes, dor abdominal, palidez e mudança de hábito intestinal (MORENO et al. 2016). Para o diagnóstico de CCR, o exame padrão-ouro é a colonoscopia, a qual possibilita a biópsia de pólipos suspeitos para análise histopatológica e ainda sua excisão terapêutica (REX et al. 2015).

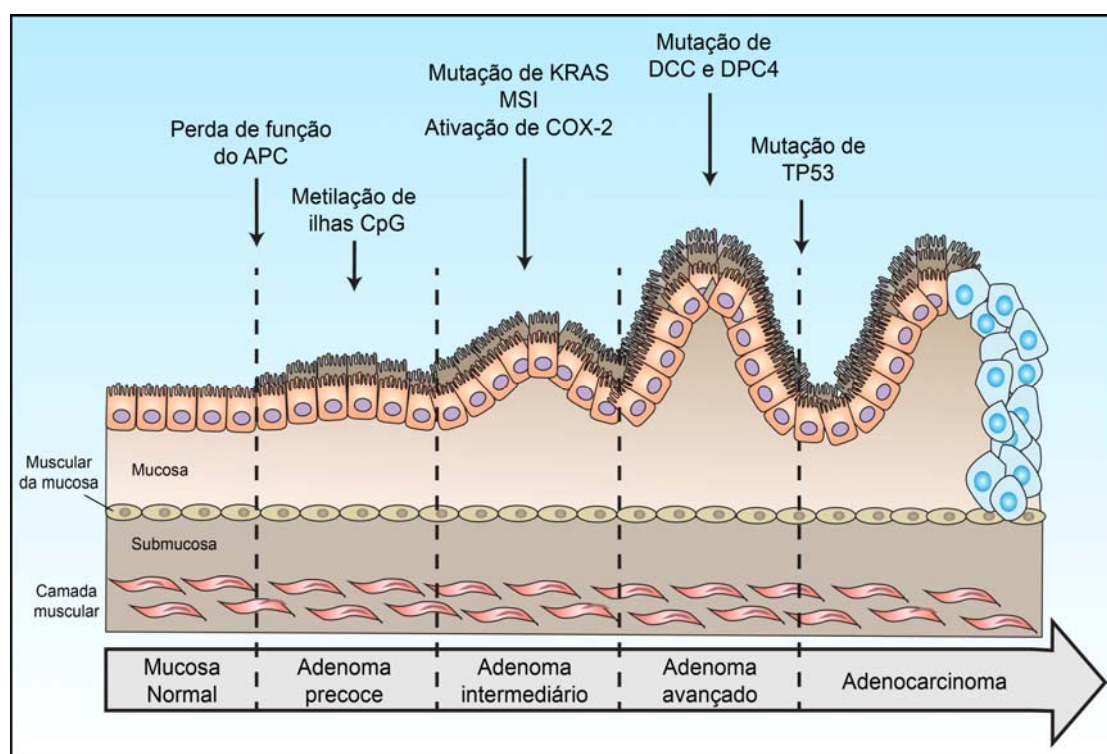
O tratamento é feito de acordo com o estadiamento, o qual se baseia no tamanho do tumor, invasão linfonodal e na presença de metástases, e define o prognóstico dos pacientes (GUNDERSON et al. 2010). Com isso, o tratamento do CCR em estágios iniciais é feito através de ressecção cirúrgica exclusiva, já em estágios intermediários é feita a ressecção cirúrgica acrescida de retirada apropriada dos linfonodos e quimioterapia



adjuvante. Pacientes com CCR metastático são submetidos à quimioterapia associada ou não à terapia-alvo.

- PATOGÊNESE

O desenvolvimento do câncer colorretal constitui-se em um processo de passos consecutivos que se inicia com o epitélio normal, passando por lesões displásicas, até o carcinoma (Figura 2) (PINO e CHUNG 2010).



Fonte: Adaptado de LONGO et al. (2015) e FEARON e VOGELSTEIN (1990)

**Figura 2** - Patogênese do câncer colorretal esporádico.

Os tumores colorretais podem ser divididos em 3 grupos distintos, de acordo com a via de carcinogênese: hereditários, esporádicos e inflamatório.

- CCR HEREDITÁRIO

O CCR proveniente de causas hereditárias pode ser dividido em dois subgrupos principais, baseados na presença de pólipos: câncer colorretal hereditário sem polipose (CCHNP) e a polipose adenomatosa familiar (PAF). Ambos CCHNP e PAF são caracterizados pela maior incidência de CCR em indivíduos jovens, em torno de 45 anos (LYNCH e DE LA CHAPELLE 2003).

CCHNP é também conhecida como Síndrome de Lynch. Dentre os pacientes com CCR, em torno de 1-6% são relacionados a CCHNP (LYNCH e DE LA CHAPELLE 2003). CCHNP é uma doença autossômica dominante causada por mutações nos genes de reparo do DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), resultando em instabilidade de microssatélites (MSI), e *EPCAM*. Com isso, ocorrem múltiplas mutações que podem contribuir para a carcinogênese colorretal (YURGELUN et al. 2012). Assim, mutações em genes que codificam beta-catenina, TGF-beta R2, BAX, APC e KRAS podem ser identificados em tumores de pacientes com CCHNP devido à instabilidade genética (BOLAND e GOEL 2010).

PAF é uma doença autossômica dominante com penetrância de 100%, caracterizada pela presença de centenas a milhares de adenomas colorretais. PAF contribui com aproximadamente 1% dos pacientes com CCR. Comparado com a média de idade de 70 anos ao diagnóstico de CCR esporádico, os pacientes com PAF desenvolvem CCR com idade em torno de 40 anos, ou 10-15 anos após o surgimento dos pólipos (GALA e CHUNG 2011). A PAF é causada por mutações no gene supressor de tumor *APC* (*adenomatous polyposis coli*) de forma germinativa (GRODEN et al. 1991;

KINZLER et al. 1991). Contudo, a inativação do gene *APC* também ocorre em CCR esporádico (FODDE et al. 2001). A proteína APC é componente do complexo de degradação da beta-catenina e medeia a ubiquitinação e, conseqüentemente, sua degradação proteossômica. Dessa forma, a ausência de APC leva ao acúmulo intracitoplasmático de beta-catenina, a qual transloca para o núcleo e estimula a proliferação celular através da ativação transcricional de *c-myc* e ciclina D1, resultando na formação dos adenomas. Nesse contexto, foi demonstrado experimentalmente que é possível restaurar a função normal de células de CCR ao restaurar os níveis de APC, ressaltando a importância dessa proteína na patogênese do CCR e trazendo a perspectiva de novos tratamentos (DOW et al. 2015).

- CCR ESPORÁDICO

CCR não associado com doenças hereditárias são definidos como CCR esporádicos. O desenvolvimento do CCR tipicamente segue vários passos consecutivos (Figura 2) (FEARON e VOGELSTEIN 1990).

O CCR esporádico surge como resultado do desenvolvimento de instabilidade genômica. As duas principais instabilidades genômicas que contribuem para a carcinogênese colorretal são instabilidade cromossômica (CIN – *chromosome instability*) e instabilidade de microssatélite (MSI – *microsatellite instability*), correspondendo a 85 e 15% dos CCR esporádicos, respectivamente (ITZKOWITZ e YIO 2004).

A CIN resulta em segregação anormal dos cromossomos com surgimento de aneuploidia. Como resultado, perda de material genômico

(perda de heterozigotidade – LOH, *loss of heterozygosity*) acontece com frequência, contribuindo para a perda de função de importantes genes supressores de tumor (ITZKOWITZ e YIO 2004). Nesse contexto, a perda somática da função do APC é um dos primeiros eventos moleculares que acontece, levando à ativação da via de sinalização Wnt/beta-catenina e subsequente transcrição de genes relacionados à proliferação celular (DOW et al. 2015). Outro evento frequentemente observado nos estágios iniciais do desenvolvimento do adenoma é a hipermetilação de ilhas CpG de genes envolvidos no controle do ciclo celular e no reparo do DNA (BERMAN et al. 2012).

Na progressão para adenoma intermediário, são encontradas mutações de ativação no proto-oncogene *KRAS*, as quais são encontradas em aproximadamente 30% (PHIPPS et al. 2013) a 50% (BOS et al. 1987) dos tumores colorretais esporádicos. As mutações que ativam a proteína *KRAS* levam à ativação da via de sinalização intracelular com fosforilação das proteína-treonina-quinases RAF-MEK-ERK, resultando em estímulos aberrantes de diversos processos celulares, como proliferação e crescimento, que contribuem para a progressão tumoral (ROBERTS e DER 2007). Caso a mutação do *KRAS* ocorra em lesões não displásicas do cólon, sem mutação prévia do *APC*, não ocorre evolução para neoplasia colorretal. Dessa maneira, torna-se evidente a necessidade da sequência de eventos para que haja a progressão do CCR (JEN et al. 1994). Concomitantemente, também pode ocorrer a perda de expressão de enzimas de reparo de DNA, com consequente MSI, assim como o aumento da expressão de

cicloxygenase-2 (COX-2) (WANG e DUBOIS 2010).

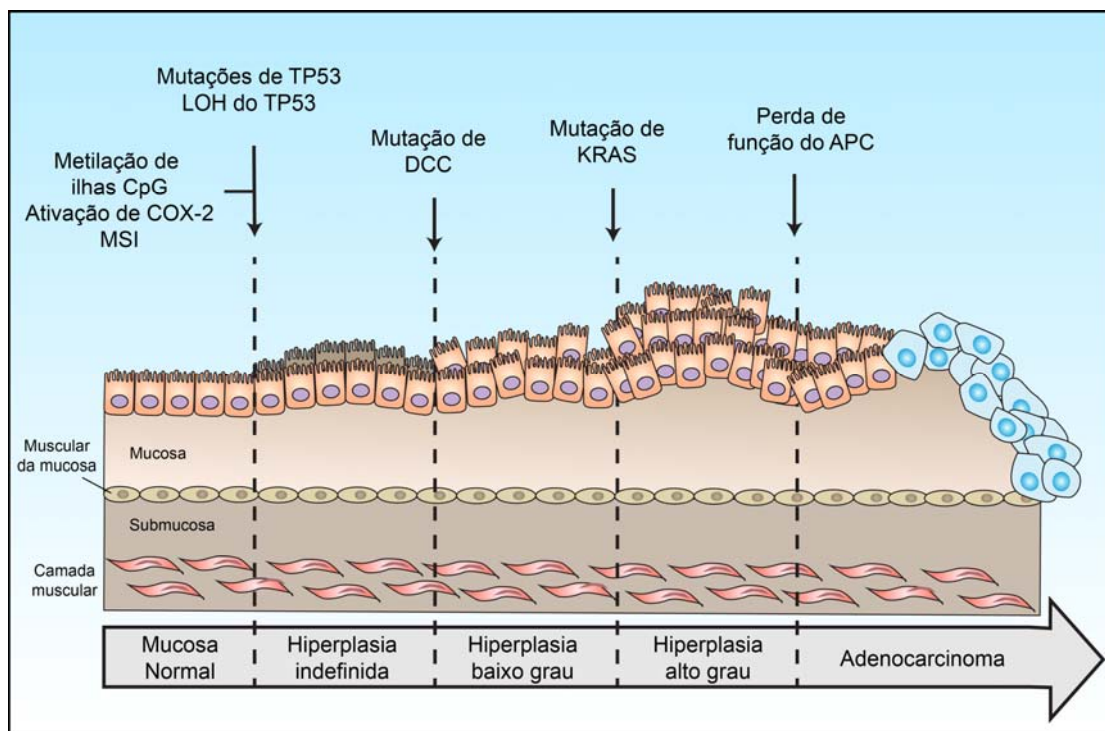
Durante a progressão do adenoma, com o aumento do seu tamanho e do grau de displasia, outras alterações genéticas podem acontecer, como a perda da função de genes supressores de tumor no cromossomo 18q na região do gene *DCC* (*deleted in colorectal cancer*) e do gene deletado em câncer pancreático (*DPC4*) (MEHLEN e FEARON 2004). Outra importante mutação com perda de função acontece com o *TP53*, a qual pode ser identificada em 40-50% dos casos de CCR esporádico, ocorrendo na transição de adenoma para carcinoma (ITZKOWITZ e YIO 2004). Adicionalmente, podem ser identificadas diversas mutações em pelo menos 32 genes em tumores de CCR (MUZNY et al. 2012).

- CCR INFLAMATÓRIO

As doenças inflamatórias intestinais (DII), incluindo doença de Crohn e retocolite ulcerativa, são caracterizadas por sua apresentação progressiva e crônica. De maneira similar ao CCR esporádico, a carcinogênese colorretal em pacientes com DII acontece como uma sequência de episódios de mutações somáticas e expansão clonal, e apresenta alterações genéticas similares (ITZKOWITZ e YIO 2004).

Contudo, diferentemente do CCR esporádico, onde as lesões displásicas são focais, no câncer associado à colite (CAC), a displasia tem distribuição multifocal e sua sequência ocorre a partir do epitélio normal, passando por um epitélio inflamado sem displasia, seguido da presença de displasia indefinida, displasia de baixo e alto grau até carcinoma

(ITZKOWITZ e HARPAZ 2004). Além disso, fatores que distinguem o CAC do CCR esporádico são diferenças no momento e na frequência das alterações genéticas (Figura 3).



**Fonte:** Adaptado de LONGO et al. (2015) e FEARON e VOGELSTEIN (1990)

**Figura 3** - Patogênese do câncer colorretal inflamatório.

A perda de função do *APC*, por exemplo, considerado como um evento precoce no carcinoma esporádico, é menos frequente e usualmente ocorre em fases tardias da sequência displasia-carcinoma do CAC (DOW et al. 2015). Perdas de alelo do *APC* são raramente encontradas na mucosa intestinal que são negativos ou indefinidos para displasia, e estão presente em apenas 14% dos tecidos com displasia de baixo grau (UMETANI et al. 1999). Ao todo, mutações do *APC* ocorrem em menos de 33% dos casos de

CAC (UMETANI et al. 1999).

Em contrapartida, o *TP53* exerce um papel primordial no CAC. A deleção do alelo do *TP53* ocorre em 50-85% dos cânceres (YIN et al. 1993). Além disso, LOH do *TP53* tem uma correlação direta com a progressão tumoral, ocorrendo em 6% em biópsias sem displasia, 9% com displasia indefinida, 33% e 63% em displasia de baixo e alto grau, respectivamente, e 85% em carcinoma (BURMER et al. 1992). Adicionalmente, mutações no *TP53* podem surgir em tecidos não displásicos ou em displasia indefinida, podendo configurar um evento precoce, antes da LOH do *TP53* (BRETNALL et al. 1994). Além disso, uma alta frequência de mutações do *TP53* foram encontrados em tecido inflamado de pacientes com colite mas sem câncer, indicando que a inflamação crônica pode predispor essas mutações (HUSSAIN et al. 2000).

A metilação também contribui substancialmente para os mecanismos de carcinogênese do CAC. Metilação de ilhas CpG de vários genes parecem preceder as alterações displásicas e são mais bem distribuídas no cólon de pacientes com DII (ISSA et al. 2001).

Além desses fatores, na carcinogênese do CAC, vários genes associados a inflamação têm sua expressão aumentada na mucosa inflamada e permanecem elevados no CCR, como a *COX2* e *NOS2* (*Nitric Oxide Synthase 2*) (ITZKOWITZ e YIO 2004).

Uma importante pergunta seria como a inflamação resulta em transformação maligna e progressão tumoral. A principal hipótese é que as espécies reativas liberados na inflamação crônica seriam os responsáveis

pela carcinogênese. As espécies reativas têm uma grande variedade de alvos, como o DNA, RNA, proteínas e lipídios. Dentre eles, genes supressores de tumor, como o *TP53*, e genes do sistema de reparo do DNA, gerando MSI e CIN (ITZKOWITZ e YIO 2004).

## 1.2 DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

As duas principais formas de doença inflamatória intestinal (DII), Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU), são doenças inflamatórias crônicas com ciclos de recidiva e remissão, com alta prevalência no Ocidente (ANANTHAKRISHNAN 2015). Enquanto a RCU afeta basicamente a mucosa e a submucosa do cólon e reto de maneira contínua, a DC pode apresentar-se descontinuamente, afetando todo o trato gastrointestinal e suas camadas (ODZE 2003).

Atualmente, a incidência anual de RCU varia de 0-19,2 por 100.000 pessoas na América do Norte e 0,6-24,3 por 100.000 pessoas na Europa, com uma prevalência de 37,5-248,6 por 100.000 e 4,9-505 por 100.000 pessoas, respectivamente. A incidência da DC é similar, 0-20,2 por 100.00 na América do Norte e 0,3-12,7 por 100.000 pessoas na Europa (MOLODECKY et al. 2012). No Brasil, a epidemiologia das doenças inflamatórias intestinais é pouco conhecida. No estado de São Paulo, foi evidenciada uma incidência de RCU e DC de 4,48 e 3,5 por 100.000 pessoas por ano, respectivamente, e uma prevalência de 14,81 por 100.000 pessoas para RCU e 5,65 por 100.000 pessoas para DC (VICTORIA et al.



2009).

A idade em que surgem os primeiros sintomas das DII é de 5 a 30 anos para a RCU, o que é relativamente precoce quando comparado a 50 a 80 anos para a DC. Enquanto não há diferenças de sexo para a DC, mulheres são afetadas com maior frequência pela RCU (ANANTHAKRISHNAN 2015).

A etiologia das DII ainda não é totalmente compreendida. Contudo, o estudo do genoma humano foi capaz de mostrar que haviam 71 loci de susceptibilidade em pacientes com DC, dos quais 17 loci estão presentes em RCU e muitos são identificados em outras condições inflamatórias (BAUMGART e SANDBORN 2012). Apesar disso, esses estudos genéticos explicam a ocorrência apenas de 20% dos casos de DC hereditários, e existe muita discordância em estudos com gêmeos monozigóticos, sugerindo o importante papel do ambiente na etiologia da doença (PARK et al. 2010).

Dentre os fatores de risco ambientais, a dieta, como alta ingestão de açúcar e gordura, está ligada diretamente a um risco aumentado de DII, (ANANTHAKRISHNAN 2015). O consumo de cigarro é um fator protetor para RCU, enquanto está relacionado a maior risco de DC. O uso de anti-inflamatórios não-esteroidais, antibióticos e anticoncepcionais também estão relacionados a maior risco de DII (BAUMGART e SANDBORN 2012).

Além desses fatores, o estilo de vida sedentário, infecções gastrintestinais e disbiose estão relacionados com maior risco de DII (ANANTHAKRISHNAN 2015).

Os principais sinais e sintomas de DII são diarreia crônica com sangue, dor abdominal e perda de peso. A colonoscopia é um dos principais exames diagnósticos de DII (LICHTENSTEIN et al. 2009; KORNBLUTH e SACHAR 2010). O tratamento da RCU baseia-se em induzir e manter a remissão dos sintomas com boa qualidade de vida, reduzindo o uso de corticóides e o risco de câncer (LICHTENSTEIN et al. 2009).

A patogênese das doenças inflamatórias intestinais tem uma importante participação da desregulação do sistema imune intestinal (XU et al. 2014), como consequência da interação com bactérias comensais ou patogênicas (BELKAID e HAND 2014). Fato esse reforçado pela identificação de polimorfismos em genes relacionados ao sistema imune (LEES et al. 2011), incluindo em genes relacionados à regulação da inflamação causada pela interação com a microbiota (CHU et al. 2016).

### **1.3 SISTEMA IMUNE INTESTINAL E DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

A mucosa gastrointestinal é exposta continuamente a diversos antígenos, dentre eles, os advindos de microrganismos que formam a microbiota intestinal. Essa exposição é continuamente regulada pela barreira de células epiteliais e sistema imune inato e adaptativo.

- **SISTEMA IMUNE INATO**

Após a barreira de células epiteliais, a resposta imune inata

representa a primeira linha de defesa contra os patógenos. As células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos, podem ser ativadas a partir do contato com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *pathogen associated molecular patterns*) liberados pela microbiota intestinal, o que resulta na consequente ligação dessas moléculas com os receptores de reconhecimento de padrão (PRR – *pattern recognition receptor*) presente nas células. Com isso, as células podem iniciar uma resposta inflamatória rápida e efetiva contra os microrganismos invasores (GEREMIA et al. 2014).

Quando há uma resposta inflamatória exacerbada, podem acontecer danos ao hospedeiro com o surgimento de doenças inflamatórias, como as DII. Há várias evidências que indicam uma importante participação das células do sistema imune inato na gênese da DII. Inicialmente, foi demonstrado em estudos de associação ampla do genoma, que pacientes com DII tem múltiplas susceptibilidades em genes envolvidos na defesa da mucosa intestinal (*NOD2*, *CARD9*, *REL*, *SLC1A*) e na apresentação de antígenos (*ERAP2*, *LNPEP*) (OGURA et al. 2001). Além disso, pacientes com doença de Crohn podem apresentar polimorfismos com perda de função no gene *NOD2*, causando disfunção em monócitos, com aumento de produção de Interleucina-1 (IL-1) (MAEDA et al. 2005).

### Macrófagos

Os macrófagos são células abundantes em toda a mucosa do trato gastrointestinal, onde está sua maior concentração em todo o corpo (LEE et

al. 1985). Os macrófagos associados a mucosa intestinal são derivados dos monócitos do sangue periférico e são recrutados para o intestino por quimiocinas ou produtos bacterianos (SMITH et al. 2005). Diferentemente dos neutrófilos, que apresentam uma alta taxa de renovação, os macrófagos maduros permanecem por longos períodos na mucosa intestinal (SMITH et al. 2005). Morfologicamente, os macrófagos associados à mucosa intestinal são similares à maioria dos macrófagos residentes, com aspecto mononuclear e citoplasma granular, e com atividade fagocítica e microbicida (SMITH et al. 2005). Essas células expressam o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II - *major histocompatibility complex class II*), F4/80 (em camundongos), CD68 (em humanos), CD64, as integrinas CD11b, CD11c e o receptor de quimiocina CX<sub>3</sub>CR1 (BAIN e MOWAT 2014).

Em uma mucosa não inflamada, os macrófagos possuem uma limitada função pró-inflamatória, caracterizada pela hiporresponsividade a PAMPs e reduzida habilidade em iniciar uma resposta imune adaptativa, contudo mantém sua capacidade de fagocitose (SMITH et al. 2005). Os patógenos são reconhecidos pelos PRRs (TLR – *toll-like receptor*, NOD – *nod-like receptor*), que induzem fagocitose e degradação intracelular dos mesmos (SMITH et al. 2005). Por outro lado, quando há inflamação intestinal, ocorre o recrutamento de monócitos e, conseqüentemente, uma conversão destes em macrófagos com um perfil pró-inflamatório. Esse perfil é marcado pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) -1, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral-alfa (TNF), que aumentam sua

função fagocítica. Essas citocinas não apenas aumentam a atividade fagocítica e de digestão intracelular, mas também funcionam como importante ligação entre a imunidade inata e adaptativa, contribuindo para a homeostase e inflamação gastrointestinal (BAMIAS et al. 2012).

Os macrófagos são didaticamente divididos em perfil inflamatório (M1) e perfil regenerativo (M2), contudo, essa divisão nem sempre se aplica, uma vez que os macrófagos têm uma grande plasticidade com funções tanto de defesa como regeneração e regulação imune, baseadas nos estímulos encontrados no meio (SICA et al. 2008).

Os macrófagos com perfil M1 podem ser ativados pela ligação dos seus receptores TLR com o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, intensificando-se na presença de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), resultando numa produção elevada de TNF. Além disso, essas células podem produzir IL-1, IL-6 e IL-23, que classicamente polarizam células T para um perfil Th17, as quais produzem IL-17 e contribuem para o recrutamento de neutrófilos (MOSSER e EDWARDS 2008). O perfil M2, por sua vez, tem sua ativação baseada na presença de IL-4, o qual estimula uma resposta intracelular dependente de arginase, resultando em menor produção de NO (óxido nítrico), maior produção de matriz extracelular e conseqüentemente maior regeneração tecidual. Adicionalmente, essas células também expressam receptores de manose (CD206) em sua membrana (MOSSER e EDWARDS 2008).

### Células dendríticas

As células dendríticas são fagócitos que possuem um progenitor comum com os monócitos ou podem ser originadas a partir deles (LIU e NUSSENZWEIG 2010). Os precursores das células dendríticas intestinais migram em um estado imaturo e tolerante, adquirindo seu perfil maduro a partir da exposição a antígenos provenientes diretamente do lúmen ou através das células M (NIESS et al. 2005). Após a exposição ao patógeno, as células dendríticas expõem os antígenos capturados em associação com o complexo MHC-II na superfície celular, momento em que ocorre a migração das células dendríticas para os linfonodos mesentéricos e a apresentação aos linfócitos que carregam o receptor TCR específico para aquele antígeno (BEKIARIS et al. 2014). Além do MHC-II, as células dendríticas apresentam comumente em sua membrana marcadores como CD11c e CD103, e moléculas coestimuladoras como CD80 e CD86 (BAIN e MOWAT 2014).

Em uma situação fisiológica, as células dendríticas têm uma baixa expressão de moléculas coestimuladoras, baixa produção de citocinas, e, quando entram em contato com as células T, estimulam preferencialmente a diferenciação em células T reguladoras (Treg), as quais produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-10, fator de crescimento tumoral-beta (TGF- $\beta$ ) e IL-4. Por outro lado, quando estão em um ambiente pró-inflamatório, como ocorre nas DII, as células dendríticas são ativadas e estimulam as células T efectoras (GROSS et al. 2015).

### Neutrófilos

Os neutrófilos são células polimorfonucleares de origem mieloide presentes em grande quantidade no sangue, representando entre 50-60% dos leucócitos circulantes (SADIK et al. 2011). Os neutrófilos são componentes da imunidade inata responsáveis por proteger o organismo de diversos patógenos, através das suas funções de degranulação e fagocitose (AMULIC et al. 2012). Além disso, os neutrófilos são capazes de produzir grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e outras moléculas tóxicas contra patógenos (CROSS e SEGAL 2004). Outro componente do arsenal microbicida dos neutrófilos consiste de diferentes grânulos intracelulares contendo peptídeos antimicrobianos (defensinas), mieloperoxidase, enzimas hidrolíticas, proteases, que são liberados quando há contato com microrganismos (BORREGAARD et al. 2007). Por fim, mais recentemente, foi descoberta a capacidade dos neutrófilos de aprisionar e destruir microrganismos através da liberação de um misto de moléculas tóxicas do material intracelular associado ao material genético, conhecido por NET (*neutrophil extracellular trap*) (BRINKMANN et al. 2004).

Esses mecanismos de defesa dos neutrófilos contra patógenos são empregados na mucosa intestinal quando há translocação patogênica. Adicionalmente, durante a resposta inflamatória, os neutrófilos contribuem para o recrutamento e ativação de outras células imunes através da produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, quimiocinas, metaloproteases, além de contribuir para a regeneração tecidual através da resolução da inflamação (MANTOVANI et al. 2011). Embora essa resposta

de defesa seja claramente benéfica para o hospedeiro, um recrutamento excessivo de neutrófilos no intestino em condições patológicas, como nas DII, está associado a danos da mucosa e piora da doença (FOURNIER e PARKOS 2012).

- SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO

Diferentemente da resposta imune inata, o sistema imune adaptativo é altamente específico, pode desenvolver memória imunológica, e tem os linfócitos T como suas principais células. Normalmente, as células T cooperam entre si e com o sistema imune inato na tentativa de eliminar patógenos invasores. Os linfócitos T são originados dos linfoblastos da medula óssea, e amadurecem no timo, onde adquirem os receptores de membrana CD4 (ou CD8) e TCR (GEREMIA et al. 2014).

As células Th0 (*T helper*) podem ser ativadas e diferenciar em subtipos Th1, Th2 ou Th17, um processo essencial para a remoção de patógenos. Simplificadamente, as células Th1 são essenciais para a eliminação de patógenos intracelulares, as células Th2 estão envolvidos no combate a parasitas e medeiam o processo alérgico. Já as Th17 podem contribuir na eliminação extracelular de bactérias e fungos (GEREMIA et al. 2014).

Por outro lado, uma resposta desregulada de células T pode desencadear inflamação exacerbada e deletéria ao hospedeiro através da liberação excessiva de citocinas e quimiocinas. Baseados nos níveis de citocinas liberadas por células T detectados em pacientes com DII, vários



estudos tem associado as DII a subtipos diferentes de resposta imune. Nesse contexto, pacientes com doença de Crohn tem uma resposta Th1 (maior produção de IFN- $\gamma$ ) mais pronunciada que pacientes com RCU, e ambos produzem resposta Th17 (produção de IL-17 aumentada) maior que em pacientes normais. Enquanto isso, pacientes com RCU produzem menor resposta Th2 comparado com pacientes com DC e indivíduos saudáveis (GEREMIA et al. 2014).

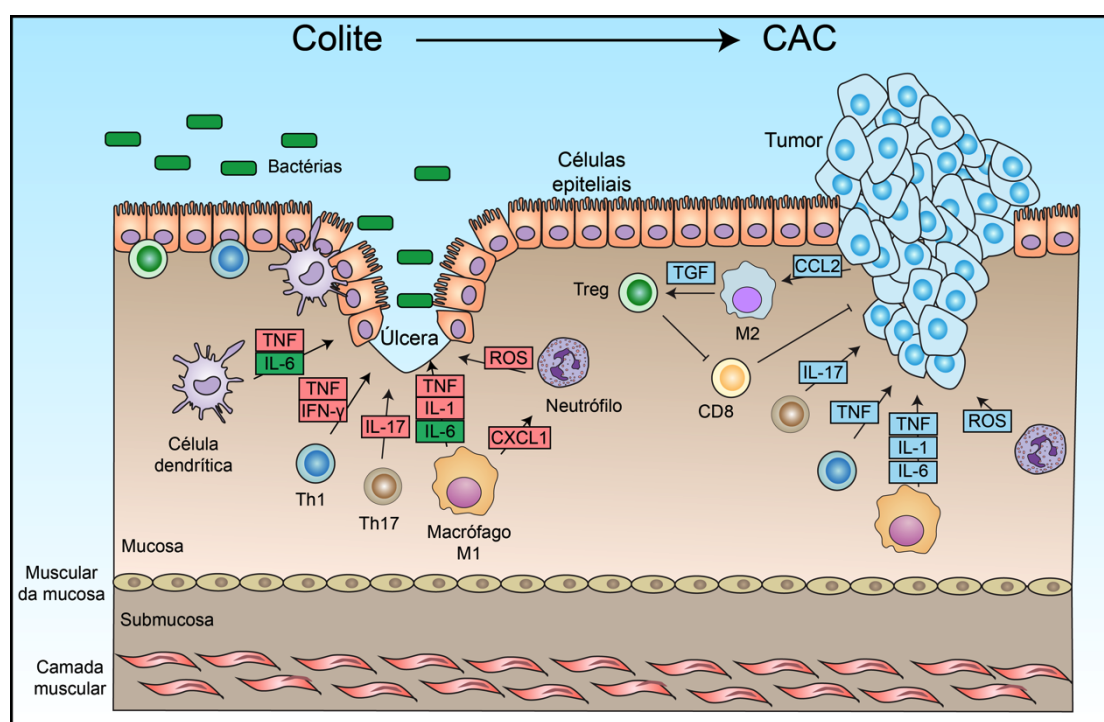
As células Treg são caracterizada pela expressão de Foxp3 e tem o potencial de suprimir a proliferação das células Th0 (O'GARRA e VIEIRA 2004). As Treg estão crucialmente envolvidas na manutenção da homeostase da mucosa intestinal através da supressão de respostas imunes anormais contra a microbiota e antígenos provenientes da alimentação. Essas células exercem sua função por meio da produção de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF- $\beta$ , e por prevenir a ativação e função das células T que escaparam de mecanismos de tolerância (O'GARRA e VIEIRA 2004).

Na colite experimental, as células Treg exercem um importante papel anti-inflamatório ao inibir a inflamação dependente de Th1 (FANTINI et al. 2006). Corroborando esse fato, pacientes com DII ativa apresentam baixos níveis de Treg no sangue periférico (CHAMOULARD et al. 2009). Por outro lado, esses pacientes possuem níveis aumentados de Treg na mucosa intestinal (EASTAFF-LEUNG et al. 2010). Contudo, as células T efetoras se tornam não responsivas à inibição das Treg (FANTINI et al. 2009). Dessa forma, tanto a redução da atividade anti-inflamatória das células Treg como o aumento dos mecanismos efetores podem ser considerados relevantes na

patogênese das DII.

## 1.4 SISTEMA IMUNE INTESTINAL E CAC

A imunidade inata e adaptativa têm um papel essencial no desenvolvimento do CAC (Figuras 3 e 4).



**Fonte:** Adaptado de SICA et al. (2008) e NEURATH (2014)

**Figura 4** - Papel do sistema imune na patogênese do CAC. As células intestinais são expostas a patógenos, ocorre uma resposta inflamatória exacerbada, com a presença de colite (úlceras). Com o progredir da colite, ocorre transformação maligna e as células presentes passam a formar o microambiente de suporte para o tumor. No contexto da úlcera, as caixas vermelhas representam um efeito patogênico e as caixas verdes um efeito regenerativo. No CAC, as caixas azuis representam efeitos pró-tumorais e a linha com ponta fechada representa inibição.

Durante o curso da inflamação intestinal, os macrófagos assumem o fenótipo pró-inflamatório (M1), com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais participam na indução de mutações das células do epitélio intestinal ao danificar o DNA (SICA et al. 2008; GRIVENNIKOV et al. 2010), e de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 $\beta$ , as quais ativam o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, contribuindo para a iniciação do CAC (GRETEN et al. 2004). Por outro lado, os macrófagos M1 podem apresentar, durante a carcinogênese colorretal, atividade tumoricida (FORSSELL et al. 2007; ENGSTRÖM et al. 2014). Em estágios mais avançados, as células tumorais liberam quimiocinas (CCL2) e fatores de crescimento, como fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), angiopoietina, os quais atraem os monócitos e os convertem em macrófagos associados ao tumor (TAM) (SICA et al. 2008). Nessa fase, o tumor apresenta um padrão anti-inflamatório, com produção exacerbada de IL-10 e TGF- $\beta$ , as quais modificam os TAM na direção M2 do espectro de polarização (SICA et al. 2008). Com isso, os macrófagos adquirem uma atividade pró-tumoral, na medida em que induzem a evasão ao sistema de vigilância imunológica e secretam mediadores que promovem a angiogênese e linfangiogênese, estimulam a proliferação celular e inibem a apoptose (SICA et al. 2006).

As células dendríticas podem estar presentes no microambiente de tumores colorretais e estão associadas a maior sobrevida no cenário clínico (DADABAYEV et al. 2004; SANDEL et al. 2005). Em modelo experimental de CAC, a desregulação de células dendríticas pela deleção genética do

fator de transcrição T-bet promove uma pior colite e maior crescimento tumoral, e ao restabelecer os níveis de T-bet nessas células, foi demonstrada uma redução da carcinogênese (GARRETT et al. 2009).

Assim como os macrófagos, os neutrófilos, produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e também espécies reativas que são essenciais no desenvolvimento do CAC (SHANG et al. 2012). Os neutrófilos associados ao tumor (TAN), similarmente aos macrófagos, podem apresentar características anti-tumorais (N1) ou pró-tumorais (N2) (FRIDLENDER et al. 2009). Outra possível denominação para esses neutrófilos pode ser dada de acordo com sua densidade em método de separação de células, assim, os neutrófilos N2 apresentam-se com baixa densidade (LDN – *low density neutrophil*) e os neutrófilos N1 com alta densidade (HDN – *high density neutrophil*) (SAGIV et al. 2015). Os neutrófilos circulantes podem ter, em fases iniciais da progressão tumoral, um perfil anti-tumoral (HDN) e tornarem-se pró-tumorais (LDN) em estágios tardios, de maneira dependente do estímulo por TGF- $\beta$  (SAGIV et al. 2015).

As células T também podem estar envolvidas em todas as fases da carcinogênese do CAC. Em modelo experimental de CAC, a imunidade Th1 exerce o papel de reduzir o crescimento tumoral via sinalização mediada por TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . A resposta Th2, por sua vez, tem capacidade de promover alterações tumorigênicas via IL-4 (MONTELEONE et al. 2012; OSAWA et al. 2006). Por outro lado, a resposta Th17 tem importância no crescimento tumoral, mas não causa alteração na colite crônica (MARTIN et al. 2015).

As células T CD8 são conhecidas por sua habilidade citotóxica, assim, a presença de grandes quantidades de células CD8 no estroma de tumores colorretais está associada a melhor prognóstico (MEI et al. 2014). Em oposição a isso, números aumentados de células Treg nos tumores pode suprimir a atividade anti-tumoral das células Th1 e CD8, resultando em progressão tumoral (PASTILLE et al. 2014). Em fases iniciais da carcinogênese, por sua vez, as células Treg são essenciais para controlar a inflamação, assim é possível que, nesse período, elas inibam a iniciação dos tumores (PASTILLE et al. 2014).

## **1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CÂNCER COLORRETAL ASSOCIADO A COLITE**

Modelos experimentais são ferramentas essenciais para o melhor entendimento da patogênese das doenças e para testes pré-clínicos. Com o intuito de estudar o CCR esporádico e o CAC, foram desenvolvidos modelos baseados na indução da carcinogênese por deleção de genes supressores tumorais (por exemplo, modelo APCmin), uso de carcinógenos químicos ou agentes pró-inflamatórios (NEUFERT et al. 2007).

- **AZOXIMETANO/DEXTRAN SULFATO DE SÓDIO**

Um dos modelos animais de CAC mais utilizados é o modelo azoximetano/dextran sulfato de sódio (AOM/DSS) (BECKER et al. 2004). AOM é um metabólito da dimetil-hidrazina e exerce seu mecanismo

carcinogênico através da alquilação do DNA (PAPANIKOLAOU et al. 1998). Em comparação com a dimetil-hidrazina, o AOM tem maior potência e estabilidade em solução (PAPANIKOLAOU et al. 1998). O AOM é injetado por via intraperitoneal, sendo metabolizado pelo fígado e excretado na bile (NEUFERT et al. 2007). Múltiplas injeções de AOM resultam em tumores colorretais distais com características histológicas similares ao CCR humano (NEUFERT et al. 2007). Na tentativa de mimetizar o CAC, foi desenvolvido um modelo que associa o AOM a três ciclos de DSS diluído na água de consumo, levando à indução de colite crônica. Esse modelo acelera a formação e o crescimento de tumores colorretais (BECKER et al. 2004).

Pacientes com câncer colorretal podem apresentar diversas complicações durante o curso da doença, as quais podem ser consequências da doença ou do tratamento empregado. Dentre essas complicações, a sepse tem sua importância devido a sua alta letalidade. Os pacientes que sobreviveram a sepse, não relacionada à quimioterapia, apresentam uma pior sobrevida câncer-específica em comparação a pacientes com câncer colorretal sem intercorrência (ATTIÉ et al. 2014).

## **1.6 SEPSE**

A sepse representa um problema de saúde de repercussão global com altos índices de morbidade e mortalidade e grande impacto econômico e é definida como uma doença com disfunção de órgãos grave causada pela desregulação da resposta do hospedeiro à infecção (SINGER et al. 2016).

Durante seu curso, ocorre uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS), caracterizada por hipertermia, taquicardia e neutrofilia, como resposta a uma infecção específica (SINGER et al. 2016).

O choque séptico pode ser definido como um subtipo de sepse em que ocorre anormalidades circulatórias e celulares suficientes para aumentar substancialmente a mortalidade (SINGER et al. 2016).

Nos protocolos anteriores de diagnóstico e tratamento, a sepse vinha sendo caracterizada como uma infecção que cursa com dois ou mais critérios de SIRS (hiper ou hipotermia, taquicardia, taquipneia, leucocitose ou leucopenia) (American College of Chest Physicians-ACCP 1992). Com isso, muitos pacientes apresentavam os critérios de SIRS e podiam não apresentar a sepse (SINGER et al. 2016). Além disso, sepse grave era uma definição comumente empregada, caracterizada pela evolução da sepse para uma disfunção orgânica. Entretanto, critérios utilizados para a quantificação dessa disfunção não estavam bem estabelecidos e padronizados e portanto foram redefinidos (SINGER et al. 2016).

Globalmente, estima-se que a incidência de sepse seja de 31,5 milhões de pessoas por ano, com uma mortalidade de 5,3 milhões (FLEISCHMANN et al. 2016). Contudo, essa estimativa é um pouco prejudicada pela falta de dados em grande parte dos países pouco desenvolvidos ou em desenvolvimento. Nos Estados Unidos, as admissões hospitalares por sepse ultrapassam as internações por infarto ou acidente vascular cerebral (SEYMOUR et al. 2012). A incidência de sepse nos Estados Unidos é de 535 casos por 100.000 habitantes por ano (WALKEY et al. 2015), com uma

mortalidade entre 25-30% (COHEN et al. 2015). No Brasil, a taxa de mortalidade por sepse grave e choque séptico fica em torno de 34,5% (Instituto Latino Americano de Sepse-ILAS 2015).

Apesar da alta mortalidade, nos últimos anos houve um esforço internacional pelo rápido diagnóstico e tratamento da sepse (SCHORR e DELLINGER 2014).

O diagnóstico de disfunção de órgãos pode ser feito através da modificação aguda dos escores SOFA (escores de avaliação sequencial de disfunção de órgãos relacionados a sepse - *Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score*) acima de 2. Os escores SOFA avaliam o sistema respiratório, cardiovascular, hepático, nervoso, renal e a coagulação através de exame clínico-laboratorial (SINGER et al. 2016).

A identificação de disfunção de órgãos através do SOFA pode ser demorada, uma vez que requer alguns exames laboratoriais. Com isso, foi desenvolvido estatisticamente o quickSOFA (SOFA rápido), o qual utiliza apenas critérios clínicos, como frequência respiratória  $\geq 22$  incursões por minuto, alteração mental (escore da escala de coma de Glasgow abaixo de 13), pressão sistólica  $\leq 100$  mmHg. Cada alteração clínica do qSOFA corresponde a 1 ponto, e um escore  $\geq 2$  representa um pior prognóstico, requerendo assim uma maior atenção (SINGER et al. 2016).

O tratamento baseia-se na ressuscitação inicial do paciente com cristaloides endovenosos para atingir nas primeiras 6 horas uma pressão venosa central de 8-12 mmHg, pressão arterial média  $\geq 65$  mmHg, diurese  $\geq 0,5$  ml/Kg/hora e saturação de oxigênio venoso central acima de 70%.



Concomitantemente, o foco infeccioso deve ser investigado e deve ser iniciado esquema empírico de antibioticoterapia de amplo espectro até o isolamento do agente causal (DELLINGER et al. 2013).

A sepse é uma complicação prevalente em pacientes com DII (ANANTHAKRISHNAN e MCGINLEY 2013) e CCR (WILLIAMS et al. 2004), podendo alterar permanentemente o curso de outras doenças que tem o processo inflamatório na sua gênese, como o CAC.

- PATOGÊNESE

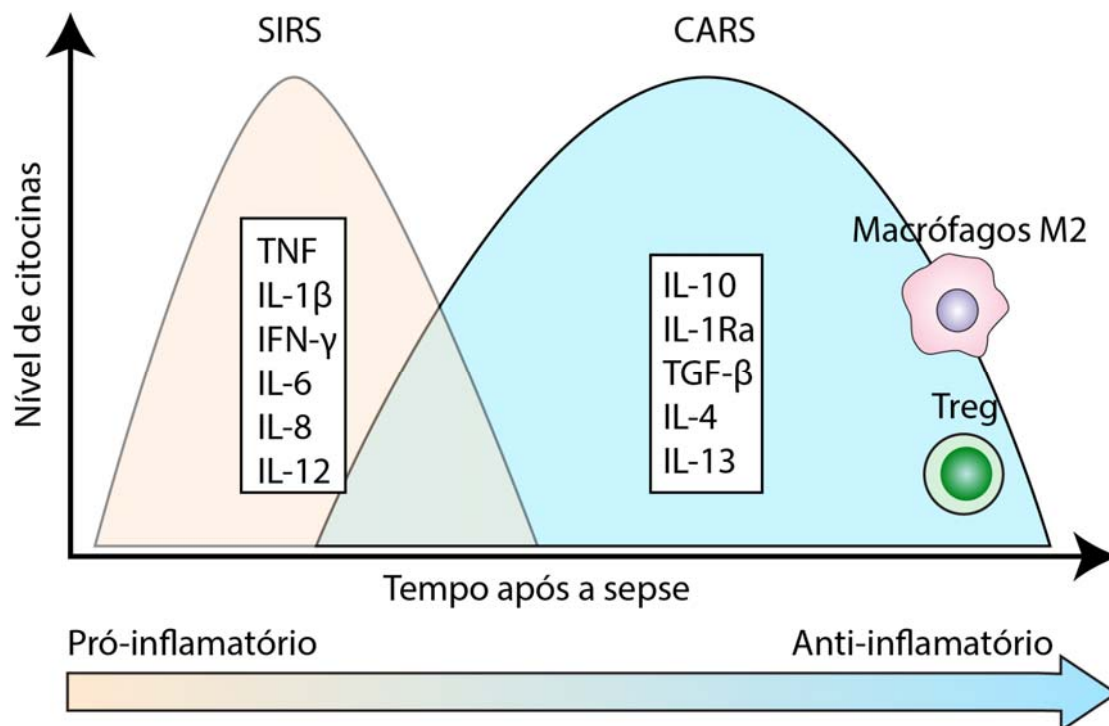
A patogênese da sepse pode ser considerada como o resultado de complexas interações da imunidade inata e adaptativa contra o patógeno. Inicialmente, os patógenos que invadem o hospedeiro liberam PAMPs, os quais ativam os PRRs das células da imunidade inata. Com isso, desencadeia-se uma cascata intracelular com ativação dos fatores de transcrição AP-1 (proteína de ativação-1) e NF- $\kappa$ B, com subsequente liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias (SÔNEGO et al. 2016). Como repercussão do processo inflamatório, ocorre uma disfunção orgânica com destruição celular, a partir de onde são liberados componentes celulares, denominados DAMPs (padrões moleculares associados ao dano - *Damage-Associated Molecular Patterns*), os quais também podem ativar os PRRs (SÔNEGO et al. 2016).

Além disso, na fase aguda da sepse, uma grande quantidade de citocinas é liberada sistemicamente, dentre elas TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e IFN- $\gamma$ , produzindo um fenômeno conhecido como tempestade de citocinas

(Figura 5). Essas citocinas e quimiocinas são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso. Clinicamente, essa fase é caracterizada pela presença de febre e choque (ANGUS e VAN DER POLL 2013).

Durante o curso da doença, os neutrófilos podem perder sua capacidade de migrar para o foco infeccioso, ocasionando seu acúmulo em órgãos distantes, os quais passam a apresentar disfunção, na medida em que os neutrófilos liberam grandes quantidades de espécies reativas e demais moléculas tóxicas (SÔNEGO et al. 2016).

Como resposta, o sistema imune produz mecanismos humorais, celulares e neuronais compensatórios para atenuar os efeitos danosos da resposta inflamatória sistêmica. Essa resposta, denominada resposta compensatória anti-inflamatória (CARS – *compensatory anti-inflammatory response*) é marcada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-10, TFG $\beta$ , IL-4, IL-13, o receptor solúvel de TNF (sTNFR) e o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) (BURAS et al. 2005). Adicionalmente, macrófagos podem assumir o perfil M2 anti-inflamatório e de reparo (WATANABE et al. 2016), e células dendríticas passam a produzir menores quantidades de IL-12 (WEN et al. 2008), proporcionando maior diferenciação dos linfócitos para células Treg (CAVASSANI et al. 2010; NASCIMENTO et al. 2010), evoluindo, assim, para um estado de imunossupressão (Figura 5).



**Figura 5** - Níveis de citocinas e de células imunes após a sepse. SIRS, síndrome da resposta inflamatória sistêmica; CARS, síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória.

Dessa maneira, pacientes que sobrevivem à sepse podem desenvolver infecções secundárias decorrentes da imunossupressão (BOOMER et al. 2011; ANGUS e OPAL 2016) e têm uma mortalidade maior que a população geral por pelo menos dois anos após a admissão desses pacientes em unidades de terapia intensiva (DAVIS et al. 2014).

Experimentalmente, o estado pós-sepse pode ser associado a um maior risco de infecção secundária (NASCIMENTO et al. 2010) e de expansão tumoral (CAVASSANI et al. 2010; MOTA et al. 2016). Essa associação entre o estado pós-sepse e a progressão tumoral adquire importância, na medida em que a sepse grave é uma complicação prevalente e com altos custos em pacientes com câncer, sobretudo câncer

de pulmão, câncer colorretal, câncer de mama e câncer de próstata (WILLIAMS et al. 2004).

## **1.7 MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE E DE IMUNOSSUPRESSÃO**

Os modelos experimentais de sepse vêm sendo desenvolvidos na tentativa de desenvolver sistemas reprodutíveis para estudar sua patogênese e testar pré-clinicamente novas terapias (BURAS et al. 2005).

Os modelos de sepse podem ser classificados em três categorias baseado no agente desencadeador: administração exógena de uma toxina (LPS), administração exógena de um patógeno vivo (bactéria) ou alteração da barreira protetora endógena do animal (indução de permeabilidade do cólon, ligadura e punção do ceco) (BURAS et al. 2005).

A ligação e punção do ceco (CLP – *cecum ligation and puncture*) é considerado o modelo padrão-ouro para a pesquisa da sepse (WICHTERMAN et al. 1980; BURAS et al. 2005), uma vez que é de fácil manejo, e apresenta boa reprodutibilidade e similaridade com doenças humanas. Esse modelo mimetiza doenças humanas como apendicite rota e diverticulite perfurada. A técnica envolve uma laparotomia medial, exteriorização do ceco, ligação do ceco distal antes da válvula ileocecal e punção do ceco ligado, gerando, assim, peritonite. A severidade da sepse pode ser avaliada pela mortalidade dos animais e ajustada pelo tamanho da agulha utilizada na punção ou pelo número de punções (BURAS et al. 2005).

Além disso, o modelo permite avaliar a imunossupressão induzida pela sepse em animais sobreviventes (NASCIMENTO et al. 2010).

Tendo em vista a crescente incidência de câncer e de sepse na população, associado ao entendimento recente de que o estado pós-sepse pode contribuir para a evolução e prognóstico da doença neoplásica, tornam-se necessários novos estudos a fim de determinar a fisiopatologia precisa dos eventos biológicos envolvidos, contribuindo assim para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

## **2 HIPÓTESE**

Nossa hipótese é que o estado de imunossupressão pós-sepse exerce efeitos biológicos distintos durante as fases de iniciação tumoral e sobre crescimento tumoral em fases mais avançadas do câncer colorretal associado à colite e que este efeito é mediado por linfócitos T reguladores (Treg).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar se no estado pós-sepse há modificação da iniciação e crescimento tumoral tardio do câncer colorretal, avaliando se o fenômeno é dependente de células Treg.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 Investigar se há alteração da iniciação tumoral no período pós-sepse;
- 2 Investigar as citocinas e quimiocinas envolvidas no processo de iniciação tumoral de animais controle e pós-sepse;
- 3 Investigar o papel das células apresentadoras de antígeno nesse processo;
- 4 Investigar se ocorre alteração no número de Treg durante a iniciação tumoral;
- 5 Investigar se a depleção de células Treg interfere na iniciação no estado pós-sepse;
- 6 Investigar se há promoção do crescimento tumoral em estágios tardios do câncer colorretal no período pós-sepse.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos isogênicos C57Bl6, animais DTR-FOXP3 (DEREG) e animais arginase-1-YFP com idade entre 06 a 09 semanas, com peso entre 18-22 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico, em um ambiente com temperatura controlada (22-25°C), com água e ração *ad libitum*, respeitando o número máximo de animais por gaiola durante todo o período do experimento. O uso dos animais está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo (USP) (Anexo 1).

O número total de animais empregado foi de 351, os quais foram subdivididos de acordo com o planejamento experimental como exposto no Anexo 2.



## 4.2 DROGAS

Ertapenem sódico (Merck Research Laboratory, Whitehouse Station, NJ) administrado 20 mg/kg/dose por animal, sendo a primeira dose injetada intraperitonealmente (i.p) 6 horas após a cirurgia de CLP (modelo de ligadura e punção cecal), e, posteriormente, as doses foram administradas também por via intraperitoneal (i.p) de 12 em 12 horas por 3 dias consecutivos.

Azoximetano (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) (AOM), potente carcinogênico, foi injetado intraperitonealmente (i.p), na dose de 10mg/Kg por animal, no dia 0 (D0) do protocolo de carcinogênese colorretal por indução química.

Dextran sulfato de sódio (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) (DSS), droga causadora de colite e indutora de carcinogênese, foi administrada durante três ciclos consecutivos consistindo em 5 dias de hidratação oral com solução de dextran sulfato de sódio a 2%, seguidos de 15 dias com água normal, sendo o primeiro ciclo iniciado no dia 5 (D5) do protocolo de carcinogênese colorretal por indução química.

Ciclofosfamida (Endoxan, Baxter, Itália) foi utilizado na dose única de 100 mg/Kg para depleção parcial de Treg.

Toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae* (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) (DTX) administrado i.p. em duas doses de 500 µg por animal por dois dias seguidos antes da injeção de AOM.

### 4.3 PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTES

- Solução de Cetamina e Xilazina

Cetamina 10% (Agener União).....1,25 mg/ml

Xilazina 2% (Agener União).....0,5 mg/ml

Salina 0.9 % q.s.p.....100 ml

A solução foi estocada à 4 °C.

- Formol 10%

Formol (Formol concentrado-Merck)..... 10,0 mL

Água destilada q. s. p.....100,0 mL

- Solução Tampão Salina-fosfato (PBS) 10X (Solução Mãe)

Cloreto de Sódio (NaCl, Merck).....80 g

Cloreto de Potássio (KCl, Merck).....2g

Fosfato de Sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Merck).....11,5 g

Fosfato de Potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck).....20 g

Água deionizada Milli-Q q.s.p.....1000 ml

A solução foi estocada à 4 °C.

- PBS 1X

PBS10X.....100ml

Água Milli-Q q.s.p.....900ml

O pH foi ajustado para pH 7.2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

- Meio RPMI incompleto (RPMI-I)

Hepes (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S, Sigma).....	2,4g
RPMI 1640 (Sigma) – 1 frasco.....	10,4g
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> , Merck).....	2,0g
Água de Milli-Q q.s.p.....	1g

O pH foi ajustado para pH 7,2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

- Meio RPMI completo (RPMI-C)

Soro bovino fetal inativado (Gibco).....	10 ml
Penicilina (Gibco).....	100 U/ml
Estreptomicina (Gibco).....	100 µg/ml
Anfotericina B (Gibco).....	2 µg/ml
L-glutamina (Sigma).....	2mM
Meio RPMI incompleto q.s.p.....	100 ml

A solução foi feita no dia do uso e utilizada gelada.

- Meio L929

Sobrenadante de sarcoma L929.....	20ml
Soro bovino fetal inativado (Gibco).....	20 ml
Penicilina (Gibco).....	100 U/ml
Estreptomicina (Gibco).....	100 µg/ml
Anfotericina B (Gibco).....	2 µg/ml
L-glutamina (Sigma).....	2mM
Meio RPMI incompleto q.s.p.....	100 ml

A solução foi estocada à 4 °C.

- Solução de congelamento

Soro bovino fetal inativado (Gibco)..... 90 ml

DMSO (Sigma).....10

ml

A solução foi feita no dia do uso e utilizada gelada.

- Ditioneitol (DTT) 1 M

DTT (Sigma)..... 3,09 g

Acetato de sódio 0,01 M pH (5,2).....15 ml

Água destilada q.s.p.....20 ml

A solução foi preparada e estocada à -20 °C.

- EDTA 0,5 M

EDTA (Labsynth).....186,1 g

Água destilada q.s.p.....1000 ml

A solução foi preparada e estocada à 4 °C.

- Solução tampão de pré-digestão:

EDTA 0,5M (Labsynth) .....1 ml

DTT 1M (Sigma).....0,1 ml

RPMI incompleto q.s.p.....100 ml

A solução foi preparada no dia do uso e utilizada gelada.

- Solução tampão de digestão:

Colagenase D (Roche).....	100 mg
DNase tipo I (Sigma).....	10 mg
RPMI incompleto q.s.p.....	100 ml

A solução foi preparada no dia do uso e utilizada gelada.

- Tampão de citometria de fluxo (Tampão de FACS):

Soro Bovino Fetal inativado (SBF-I, Difco) 2%.....	2 ml
PBS 1X q.s.p.....	100 ml

A solução foi preparada no dia do uso e utilizada gelada.

- Tampão de lise:

Cloreto de amônio (NH <sub>4</sub> Cl, Merck).....	4,01g
EDTA (Labsynth).....	0,18g
Bicarbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> , Merck).....	0,42g
Água de Milli-Q q.s.p.....	500ml

O pH foi ajustado para pH 7,2, a solução foi filtrada e estocada à 4 °C.

- Paraformaldeído 2%:

Paraformaldeído (Sigma).....	2g
Água destilada q.s.p.....	100ml

A solução foi preparada e estocada à 4 °C.

#### 4.4 MODELOS DE SEPSE E IMUNOSSUPRESSÃO PÓS-SEPSE

Sepse letal polimicrobiana foi induzida através do modelo de ligadura e punção cecal (CLP) (NASCIMENTO et al. 2010). Resumidamente, essa técnica consiste em se realizar uma pequena incisão de cerca de 1,0 cm no abdome do animal anestesiado com cetamina (12,5 mg/kg, i.p.) e xilasina (5 mg/kg, i.p.), através da qual o ceco foi exposto. Posteriormente, foi feita uma ligadura da porção livre do ceco com fio de algodão, logo abaixo da válvula ileocecal sem obstrução total, e, finalmente, fez-se uma punção no ceco com agulha 18-gauge e o ceco foi pressionado, levemente, para certificar a saída das fezes, sendo posteriormente recolocado no abdômen, e a incisão abdominal suturada. Imediatamente após o procedimento, os animais receberam reposição volêmica com 1,0 ml de solução salina estéril (0.9%) via subcutânea (s.c.) e houve a administração de ertapenem (20 mg/kg/dose) 6 horas após a cirurgia, e de 12 em 12 horas por 3 dias consecutivos.

Em dados não publicados provenientes do laboratório foi demonstrado que os animais controle sem cirurgia têm o mesmo fenótipo de animais *sham*, por isso utilizou-se animais controle sem cirurgia com o intuito de sermos menos invasivos.

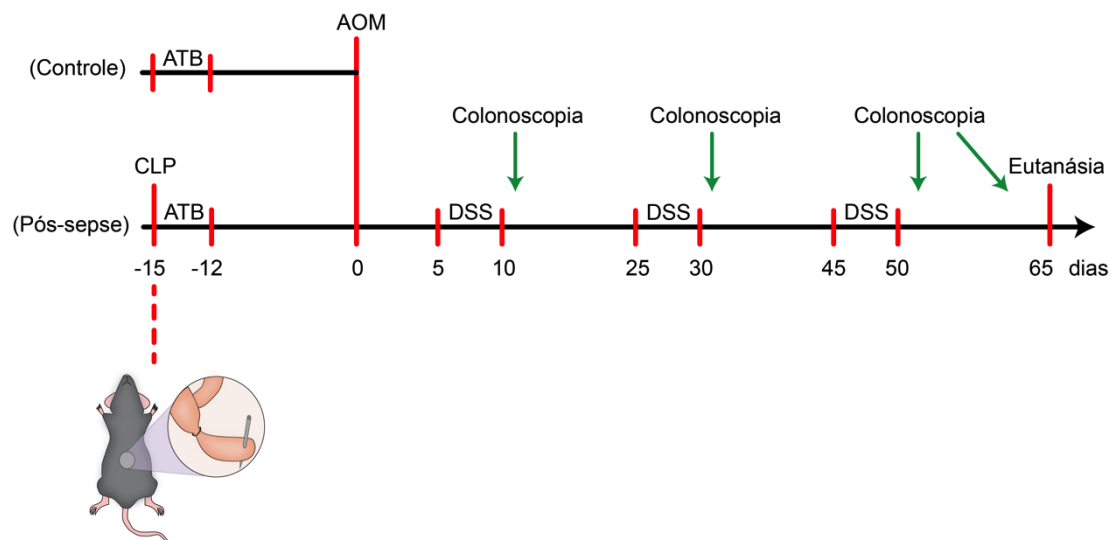
Além disso, os animais sobreviventes à sepsse desenvolvem imunossupressão com aumento de células Treg no baço até 15 dias depois da sepsse (NASCIMENTO et al. 2010). Contudo, até 60 dias após a sepsse, os animais pós-sepsse têm um maior crescimento tumoral quando

submetidos à injeção subcutânea de células de melanoma murino (MOTA et al. 2016).

#### **4.5 PROTOCOLO DE INDUÇÃO TUMORAL EM ANIMAIS PÓS-SEPSE**

Inicialmente, animais C57Bl6 que sobreviveram à sepse, e um grupo de animais controle que receberam o mesmo protocolo de ertapenem foram submetidos à carcinogênese colorretal por indução química através de azoximetano e dextran sulfato de sódio (AOM/DSS) (Figura 6). Houve a administração i.p. de azoximetano (10mg/Kg de peso dos animais) no dia 0 (D0). Após 5 dias da administração de azoximetano, os animais foram submetidos a três ciclos consecutivos, consistindo de 5 dias de hidratação oral com solução de Dextran sulfato de sódio a 2% em água, seguidos por 15 dias de água somente. Durante este período, os animais foram avaliados nos dias 12, 32 e 52 para a análise de colite por critérios clínicos e colonoscópicos.

No dia 65 foi feita a eutanásia dos animais, realizada a excisão do cólon, que foi colocado em formol tamponado 10% por 24 horas e depois em álcool 70%, e, em seguida, o material foi parafinado e foram confeccionadas lâminas para a análise histopatológica com avaliação da colite e das características tumorais. Assim como outros modelos, o AOM/DSS não recapitula diretamente a carcinogênese associada à colite clássica apresentada por pacientes.



**Figura 6** - Protocolo de iniciação de câncer colorretal pós-CLP. CLP, protocolo de ligadura e punção do ceco; ATB, ertapenem 20 mg/kg/dose i.p. 6 horas após a CLP e depois seis vezes a cada 12 horas; AOM, azoximetano 10 mg/kg i.p.; DSS, dextran sulfato de sódio 2% na água.

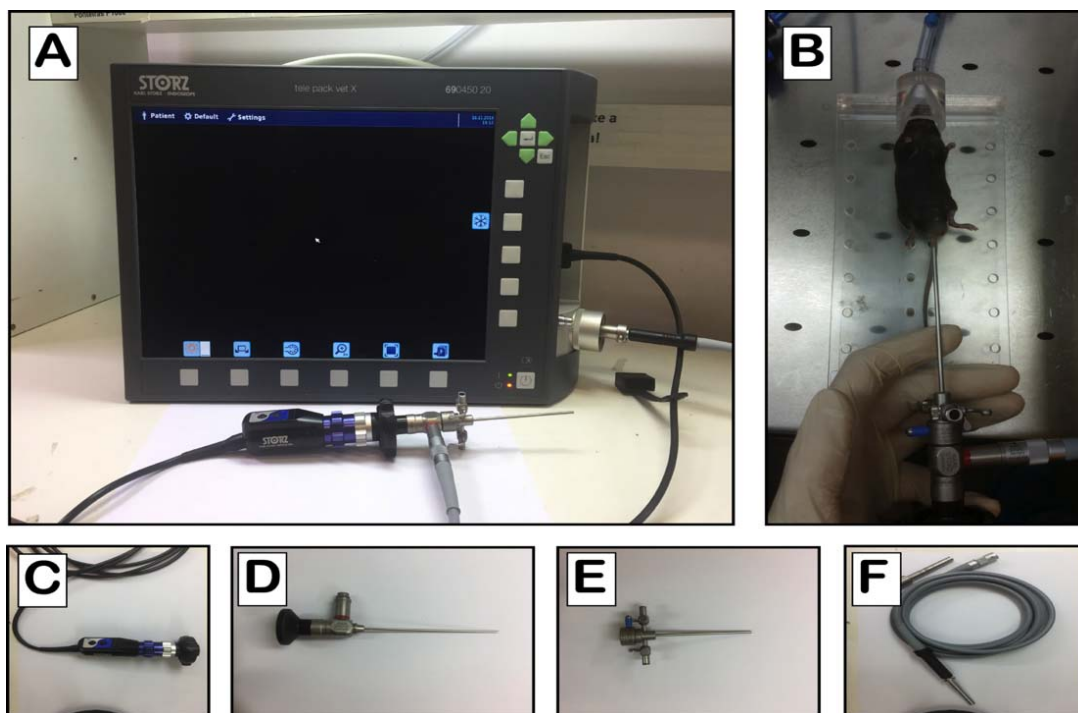
#### 4.6 COLONOSCOPIA

A colonoscopia foi realizada nos dias 12, 32, 52 e 65 do protocolo de iniciação tumoral, para avaliação da colite e da carga tumoral com equipamento de microendoscopia (TELE PACK VET X, Karl Storz®), o qual consiste de câmera, fonte de luz, monitor, cabo de iluminação com fibra ótica, endoscópio rígido (Karl Storz Hopkins®) com 30° de inclinação, diâmetro de 1,9 mm e comprimento de 10 cm, e camisa endoscópica com 2,33 mm de diâmetro (Figura 7).

Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano e posicionados em decúbito dorsal. Em seguida foi aplicado um enema com solução salina, depois o endoscópio foi introduzido por via anorretal para a



avaliação. Durante esse período as imagens eram analisadas no monitor e gravadas no formato de vídeos.



**Figura 7** - Aparelho de colonoscopia em camundongos. A – monitor, B – visão geral do procedimento, C – câmera, D – endoscópio, E – camisa do endoscópio, F – cabo de lus.

#### 4.7 ESCORES COLONOSCÓPICOS DE COLITE






Para quantificar endoscopicamente a colite, foram avaliados quatro parâmetros e adotados escores para cada alteração: achados perianais, 0 (sem achados), +1 (diarreia), +2 (sangue), +3 (prolapso retal); transparência da parede do cólon, 0 (vasos de todos os calibres visíveis, sem espessamento), +1 (grandes e médios vasos visíveis), +2 (grandes vasos pouco visíveis), +3 (sem vasos visíveis, espessamento máximo);

sangramento, 0 (sem sangramentos), +1 (sangramento devido o contato do endoscópio), +3 (sangramento espontâneo); lesões, 0 (sem lesões), +1 (edema em mucosa), +2 (erosões), +3 (úlceras). Os escores de colite variam de 0 a 12, sendo 0 a ausência de colite e 12 a colite máxima observada (KODANI et al. 2013).

#### **4.8 AVALIAÇÃO DA CARGA TUMORAL**

Os tumores observados durante a colonoscopia foram quantificados para obter o número total de tumores por animal, o tamanho de cada tumor foi quantificado de acordo com seu diâmetro (Figura 8), e foi obtida a carga tumoral colonoscópica através da soma dos tamanhos dos tumores (BECKER et al. 2006; HU et al. 2010).

Após a eutanásia dos animais, os tumores foram fotografados, contados, e cada tumor foi mensurado de acordo com seu maior diâmetro. A carga tumoral foi obtida através da soma de todos os diâmetros dos tumores.

Tamanho		Escore
Apenas detectável		1
1/8		2
1/4		3
1/2		4
>1/2		5

Fonte: Adaptado de BECKER et al. (2006)

**Figura 8** - Escores do tamanho dos tumores em relação à circunferência do cólon.

#### 4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS

- ELISA

A determinação dos níveis de TNF e CCL22 foi realizada por método imunoenzimático (ELISA). Resumidamente, as placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µl/ poço do anticorpo específico anti-TNF (R&D) e anti-CCL22 (R&D) nas concentrações descritas pelos fabricantes. Esses anticorpos foram diluídos em solução de ligação (*coating buffer*) e incubados por 18-24 horas a 4°C. As placas foram lavadas por quatro vezes com PBS/Tween-20 0,05% (Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 200 µl de PBS contendo BSA 1 % durante 1 hora a 37 °C. As amostras de tecido do cólon e o padrão (curva-padrão) contendo as

concentrações adequadas de TNF (10000 pg/ml) e CCL22 (10000 pg/ml) foram colocados nas placas (50 µl) e incubados por 12 h a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 µl dos anticorpos biotinizados específicos para cada citocina foi adicionado nas concentrações descritas pelos fabricantes. Após uma hora, as placas foram lavadas com PBS/Tween e o conjugado avidina-peroxidase, na diluição de 1/5000, foi adicionado a cada poço. A seguir, as placas foram incubadas por 45 min. Posteriormente, elas foram lavadas com PBS/Tween e o substrato (TMB) foi adicionado.

A densidade ótica foi medida a 630 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). A concentração de citocinas nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 12 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/ml.

- Milliplex

Os perfis de citocinas presentes nos cólons foram determinados usando o protocolo de *beads* magnéticas para citocinas/quimiocinas de camundongos do Milliplex® Map Kit (Cat. MCYTOMAG-70K, Merck). Resumidamente, a placa de citocinas/quimiocinas foi lavada com tampão de lavagem, selada e misturada em agitador (*shaker*) por 10 minutos em temperatura ambiente. O tampão de lavagem foi decantado e foram adicionados nos locais apropriados os padrões, os tampões testes, as soluções matrizes, as amostras provenientes dos cólons e as *beads*. A placa foi incubada *overnight* a 4°C. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi

removido e os poços foram lavados com tampão de lavagem, sendo adicionado os anticorpos de detecção contra GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, KC, IL-17 e MIG. Após mais 1 hora de incubação em temperatura ambiente, foi adicionada estreptavidina-ficoeritrina, incubando-se por 30 minutos. O conteúdo dos poços foi novamente removido e os poços lavados, após o que foi adicionado o fluido de revestimento.

Nesse momento, a placa foi lida no aparelho Luminex MagPix® e os dados foram coletados com o software Luminex xPONENT® LX100/LX200 e analisados em intensidade de fluorescência mediana usando o software Milliplex® Analyst. Os resultados foram divididos pelo peso do tecido em mg e foram expressos em pg/mg de tecido  $\times 10^2$ .

#### **4.10 DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA**

A diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foi realizada como descrito previamente (Kurowska-Stolarska et al. 2009). Os animais (n=2) foram eutanasiados por deslocamento cervical e, após esse procedimento, foram coletados os fêmures e as epífises foram cortadas para exposição do canal medular. Para remoção da medula óssea, utilizou-se uma agulha de 26-gauge acoplada a uma seringa plástica de 3,0 mL que foi inserida na cavidade medular para retirada da medula óssea através de *flushing* utilizando meio de cultura RPMI-C. A suspensão de medula óssea dos dois animais foi homogeneizada e centrifugada à 400 G, por 10 minutos,

à 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspendidas em 10,0 mL de tampão de lise e, então, novamente centrifugadas, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o *pellet* ressuspendido em 10,0 mL de meio RPMI-C para retirada total do tampão de lise. As células foram centrifugadas, o sobrenadante desprezado, e, então, foram ressuspendidas meio específico L929.

Essas células foram colocadas em 4 placas de Petri especiais (BD OPTILUX), contendo 10,0 mL do meio para macrófagos, e ficaram por 3 dias numa estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C, após este tempo, foi adicionado mais 10,0 mL do meio de diferenciação para macrófagos e retornaram para a estufa por mais 4 dias.

Após uma semana na estufa, as células foram divididas em grupos que receberam LPS (100ng/ml) ou IL-4 (10ng/ml), com ou sem administração de Dextran (3%) 1 hora antes, com três poços para cada grupo, com  $1,0 \times 10^5$  células por poço. Depois de 24 horas, as células foram descoladas em tampão fosfato salina (PBS) gelado com o auxílio de um *scraper* plástico (Cell Scraper, Corning NY). A suspensão contendo os macrófagos foi centrifugada a 400 G, por 10 minutos, a 4°C, após o que o sobrenadante foi guardado para dosagem posterior de citocinas e as células foram ressuspendidas em RPMI-C numa concentração de  $2,0 \times 10^5$  células por mL para os ensaios, onde a diferenciação dos macrófagos foi confirmada por citometria de fluxo.

#### **4.11 DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA**

As células precursoras de células dendríticas foram obtidas da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos C57Bl6 (n=2) e foram cultivadas em meio RPMI-C suplementado com GM-CSF (30,0 ng/ml).

Resumidamente, camundongos foram submetidos à eutanásia, e seus fêmures e tíbias foram cuidadosamente removidos. As epífises foram seccionadas em ambiente estéril e as medulas lavadas com meio de cultura RPMI-I utilizando uma seringa com agulha 13 x 4,5 mm.

As células coletadas foram lavadas e centrifugadas a 500 G por 10 minutos, eliminando-se o sobrenadante e incubando o sedimento com tampão de lise por 3 minutos à temperatura ambiente, após o que se procedeu um novo ciclo de centrifugação por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em RPMI-C e quantificadas em câmara de Neubauer. Por fim,  $3,0 \times 10^4$  células foram distribuídas em placas próprias para cultura (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA) na presença dos fatores de crescimento (GM-CSF) descritos inicialmente. Entre o sétimo e o nono dias de cultura, as células foram analisadas por citometria de fluxo para determinar a expressão CD11c, sendo o início dos experimentos realizado quando a porcentagem de células CD11c<sup>+</sup> (células dendríticas) estava maior ou igual a 80%.

Concomitantemente, foram delicadamente removidos os linfonodos mesentéricos dos camundongos, os quais, de forma estéril, foram passados

em peneira de propileno (Falcon® - separador de células – 70 µm) com auxílio do êmbolo da seringa de 3,0 ml (Plastipak®), com acréscimo de RPMI incompleto com o objetivo de carrear as células remanescentes, formando uma única suspensão celular, a qual foi centrifugada a 500 G, por 10 min, a 4°C. Posteriormente, as células foram analisadas por citometria de fluxo para selecionar células CD4+ com grau de pureza maior que 80%.

No mesmo poço que as células dendríticas estavam aderidas  $1,0 \times 10^5$  células, foram colocadas as células  $0,3 \times 10^5$  células CD4+, com a presença ou não de estímulo por DSS a 1%, as quais ficaram em cultura por 4 dias, quando foram coletadas para análise por citometria de fluxo com marcadores IFN-gama e IL-17.

#### **4.12 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS TREG**

Nos dias 12 e 65 do protocolo AOM/DSS, os animais foram eutanasiados para quantificação de Tregs por citometria de fluxo nos cólons, linfonodos mesentéricos e baço (FACSCanto II, BD Biosciences), após marcação com anticorpos específicos anti-CD4-FITC (clone RM4-5), anti-Foxp3-APC (clone MF23) (BD Biosciences), titulação de 1:300 e 1:250, respectivamente.

As amostras dos cólons foram processadas em solução de pré-digestão e colocadas em agitação por 30 min. Os sobrenadantes foram passados em peneira de células (Falcon® - separador de células – 40 µm) para obtenção de uma suspensão celular simples de células intraepiteliais



(IEL), e o restante do tecido foi processado com colagenase D (Roche®) e DNase I (Sigma) por 1 hora. O material obtido foi passado em peneira de propileno (Falcon® - separador de células – 100 µm) com auxílio do êmbolo de uma seringa de 3,0 ml (Plastipak®), e com acréscimo de RPMI incompleto com o objetivo de carrear as células remanescentes, formando uma única suspensão celular, a qual foi centrifugada a 400 G, por 10 min, a 4°C para formação de suspensão de células mononucleares da lâmina própria (LP) dos cólons.

As hemácias do material do baço foram lisadas por choque hiposmótico, utilizando um tampão de lise por 15 min, seguida de uma nova centrifugação. O volume foi então corrigido para se atingir 1 milhão de células por tubo e foi realizada marcação com anti-CD4-FITC. Após lavagem com PBS, as células foram permeabilizadas com tampão *Permwash* (BD Biosciences), marcadas com anti-Foxp3-APC, e incubadas por mais 1 hora.

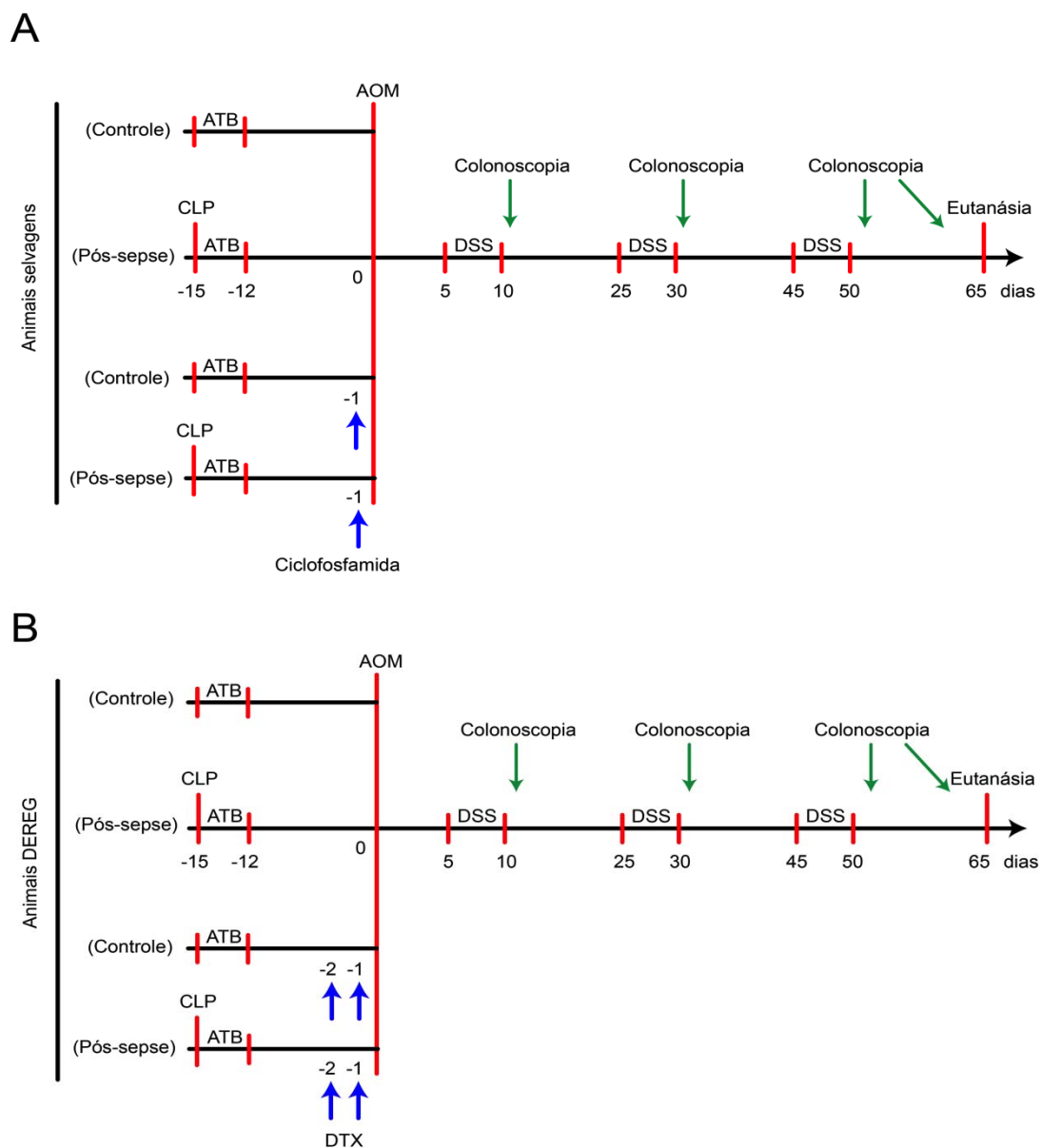
Tregs foram quantificados em citômetro de fluxo (FACSCanto, BD Biosciences) e analisados através do software FlowJo v.9. Os resultados foram expressos em quantidades relativas (porcentagens) de Tregs.

#### **4.13 PROTOCOLO DE DEPLEÇÃO DE CÉLULAS TREG EM ANIMAIS SUBMETIDOS À INDUÇÃO TUMORAL**

Animais selvagens ou animais que expressam o receptor da toxina diftérica sob controle do promotor do gene do fator de transcrição FOXP3 (DEREG) foram randomizados em dois grupos: controle ou submetido à CLP.

Os dois grupos de animais selvagens foram subdivididos em um grupo controle e outro grupo que recebeu ciclofosfamida i.p. (100 mg/Kg) em dose única um dia antes do AOM (Figura 9A). Posteriormente, esses animais foram analisados por colonoscopia nos dias 12, 32, 52 e 65 para detecção de colite e desenvolvimento de tumores.

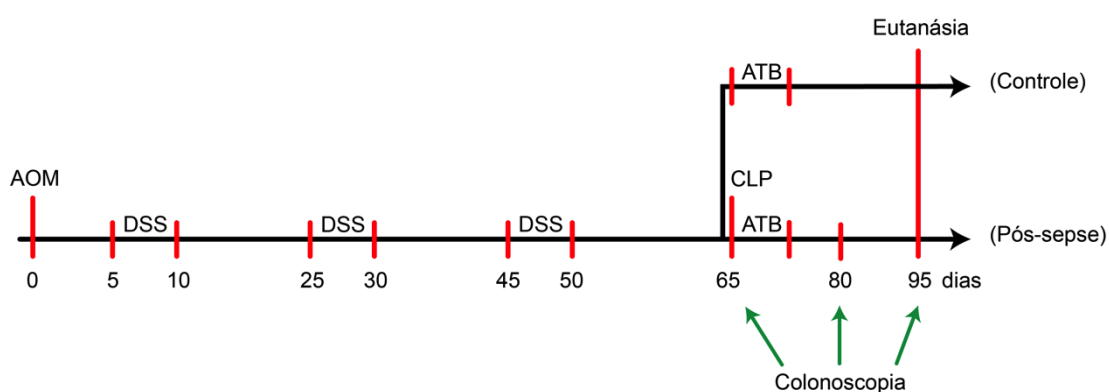
Os dois grupos de animais DEREK foram subdivididos entre os controle e os que receberam duas doses, em dias consecutivos, de toxina diftérica (0,5 mg/Kg), dois dias antes do início da indução com AOM (Figura 9B). A injeção de DTX é capaz de depletar as células Treg sistemicamente em animais DEREK (PASTILLE et al. 2014).



**Figura 9** - Protocolo de iniciação de câncer colorretal pós-sepse com depleção de Treg com ciclofosfamida (A) ou com toxina diftérica em animais DEREG (B) no início do protocolo de iniciação. ATB – ertapenem. AOM – azoximetano. DSS – dextran sulfato de sódio. DTX – toxina diftérica.

#### 4.14 PROTOCOLO DE INDUÇÃO TUMORAL SEGUIDA DE SEPSE

Animais C57Bl6 foram submetidos ao protocolo de iniciação tumoral AOM/DSS e no dia 65 foram randomizados em um grupo controle e outro grupo submetido à CLP. Nos dias 65, 80 e 95 todos os animais foram avaliados por colonoscopia para avaliação da carga tumoral (Figura 10).



**Figura 10** - Protocolo de iniciação de câncer colorretal seguido de sepse. ATB – ertapenem. AOM – azoximetano. DSS – dextran sulfato de sódio.

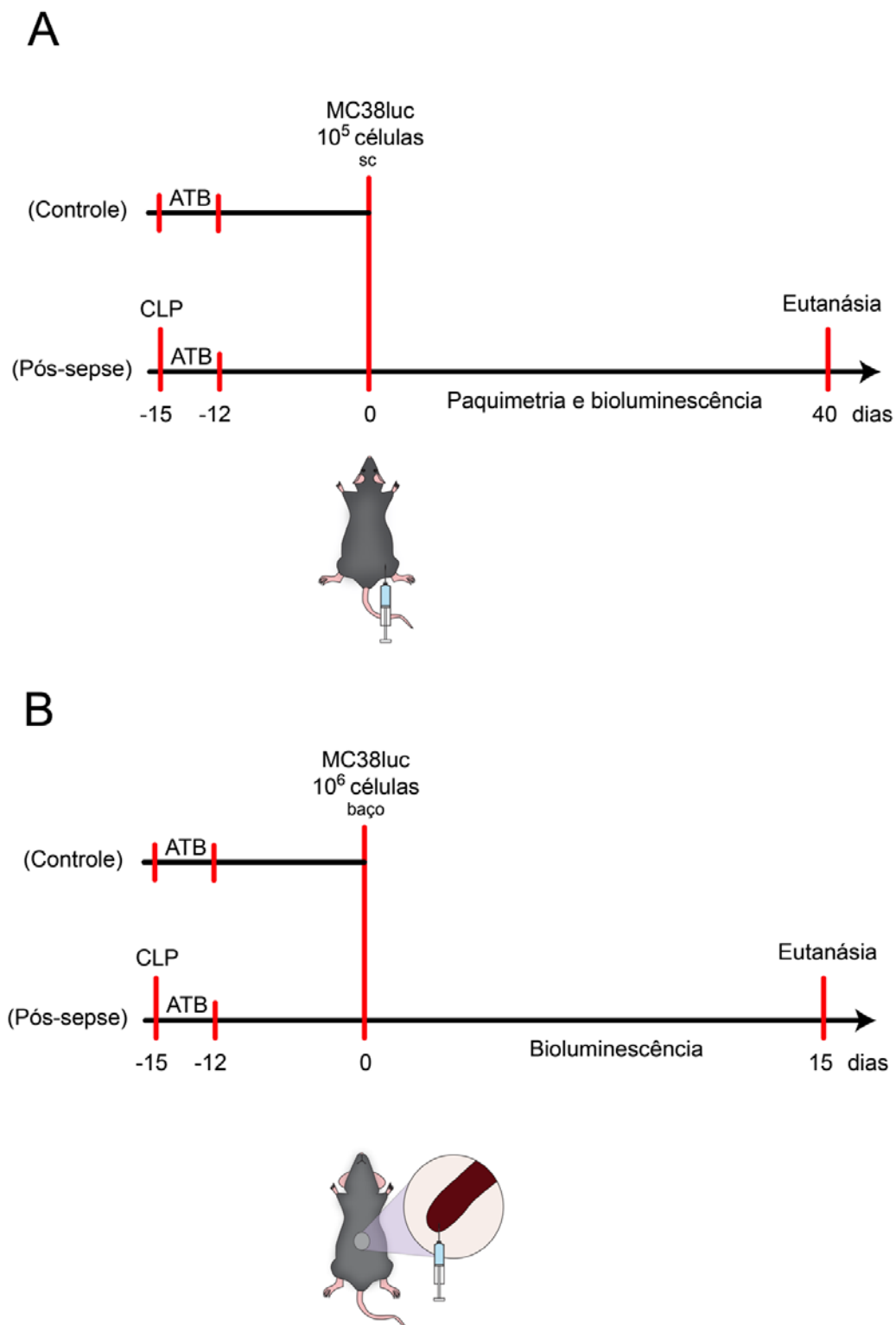
#### 4.15 LINHAGEM TUMORAL E CULTURA CELULAR

Foram empregadas células singeneicas de câncer de cólon de camundongos C57Bl/6 (MC38 transduzidas com o gene da luciferase – MC38luc). Células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas rapidamente do meio de congelamento, lavadas em meio RPMI completo por 2 vezes consecutivas e colocadas em garrafas de cultura apropriadas com meio RPMI 1640 completo. As células foram visualizadas diariamente em microscópio invertido. Quando atingiram a confluência, foi realizado descolamento das células com tripsina-EDTA 0,25% com repique na

proporção de 1:10, e na terceira passagem as células foram inoculadas nos animais.

#### **4.16 MODELO DE CRESCIMENTO TUMORAL HETEROTÓPICO EM ANIMAIS PÓS-SEPSE**

Os animais foram submetidos à anestesia com isoflurano, e foi realizada injeção de  $5,0 \times 10^4$ ,  $1,0 \times 10^5$  ou  $5,0 \times 10^5$  células MC38luc no subcutâneo do dorso direito. O crescimento tumoral foi avaliado por paquimetria e leitura de bioluminescência através de aparelho IVIS Spectrum (Xenogen, Caliper Life Sciences) após administração de D-luciferina 150 mg/kg, nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após a inoculação. Também foram inoculadas  $1,0 \times 10^5$  células em animais pós-sepse e em animais controle (Figura 11A).



**Figura 11** - Protocolo de progressão tumoral pós-CLP. (A) injeção subcutânea, (B) injeção intra-esplênica. ATB – ertapenem. MC38luc – linhagem de carcinoma colorretal murina transfectada com gene da luciferase.

#### **4.17 PROCESSAMENTO DE IMAGEM BASEADO EM BIOLUMINESCÊNCIA (PIBB)**

O PIBB foi realizado com o equipamento IVIS Lumina System® (Caliper LifeSciences).

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano 100% (Cristália) e infundidos com 150 mg/kg de D-luciferina por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram posicionados no interior da câmara escura do equipamento e mantidos sob constante sedação com isoflurano. A captura de imagens foi então iniciada e o tempo de exposição variou de 10 min a 20 min.

A intensidade de bioluminescência foi quantificada por meio uso da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do software Living Image 3.0, utilizado para operar o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi manualmente desenhada para abranger o sinal bioluminescente, cuja unidade de intensidade é o fluxo de fótons por segundo.

#### **4.18 PROTOCOLO DE COLONIZAÇÃO ESPLÊNICA EM ANIMAIS PÓS-SEPSE**

Os animais foram submetidos à anestesia com cetamina (12,5 mg/kg, i.p.) e xilasina (5 mg/kg, i.p.), após o que foi realizada laparotomia e então injetaram-se  $1,0 \times 10^4$ ,  $1,0 \times 10^5$  ou  $1,0 \times 10^6$  células MC38luc na cauda do baço.

O crescimento tumoral foi avaliado por leitura de bioluminescência através de aparelho IVIS Lumina System® (Caliper LifeSciences) após administração de D-luciferina 150 mg/kg, conforme descrito previamente, nos dias 5 10 e 20 após a inoculação. Determinou-se a menor dose capaz de causar metástase. Também realizamos experimento no qual inoculamos  $1,0 \times 10^6$  células em animais controle e sobreviventes de sepse no D15 após CLP (Figura 11B).

#### **4.19 ANÁLISE DE RESULTADOS**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (SEM) e foram analisados por ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni, ou teste t de Student, para variáveis com distribuição normal, e teste de Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn, para variáveis com distribuição não normal.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan Meier.

Em todas as análises, as diferenças entre os grupos analisados foram considerados significantes quando os valores de  $p < 0,05$ .

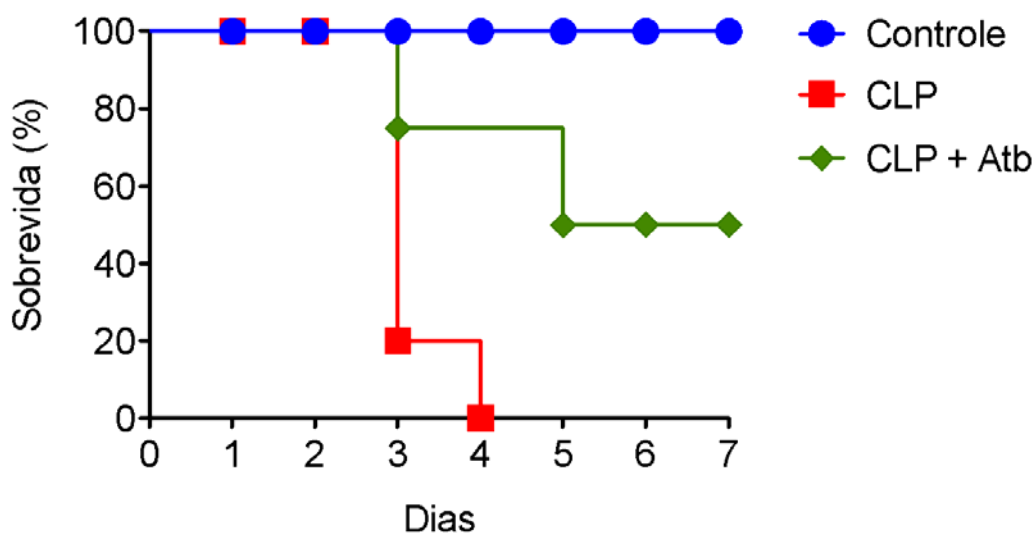
Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism v.5.01.



## 5 RESULTADOS

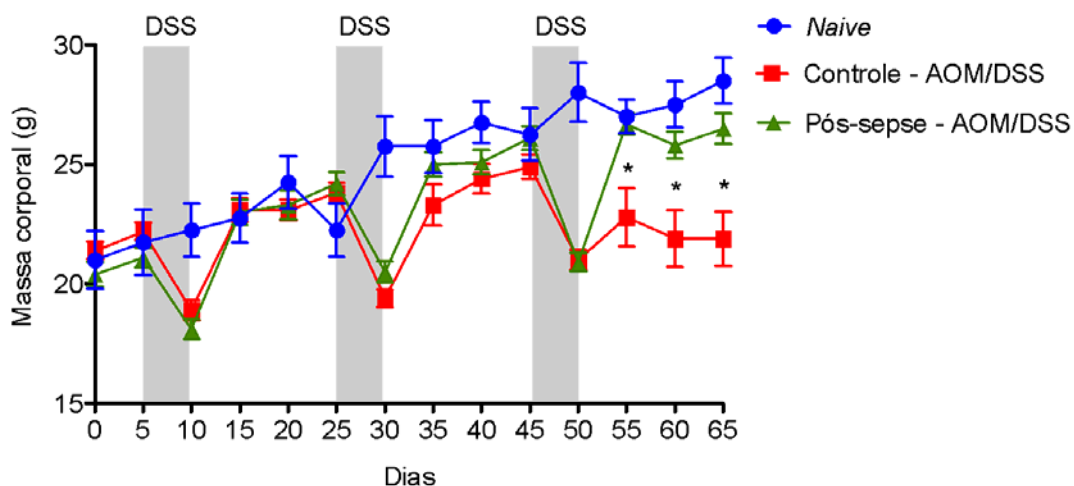
### 5.1 INICIAÇÃO TUMORAL

Inicialmente, foi realizado o experimento de sepse induzida por CLP. Os animais foram divididos em três grupos: controle, CLP letal e CLP letal com tratamento com antibiótico (ertapenem). Os animais sem tratamento morreram nos primeiros 4 dias, e dos animais que foram tratados com antibiótico, 50 % sobreviveram (Figura 12).



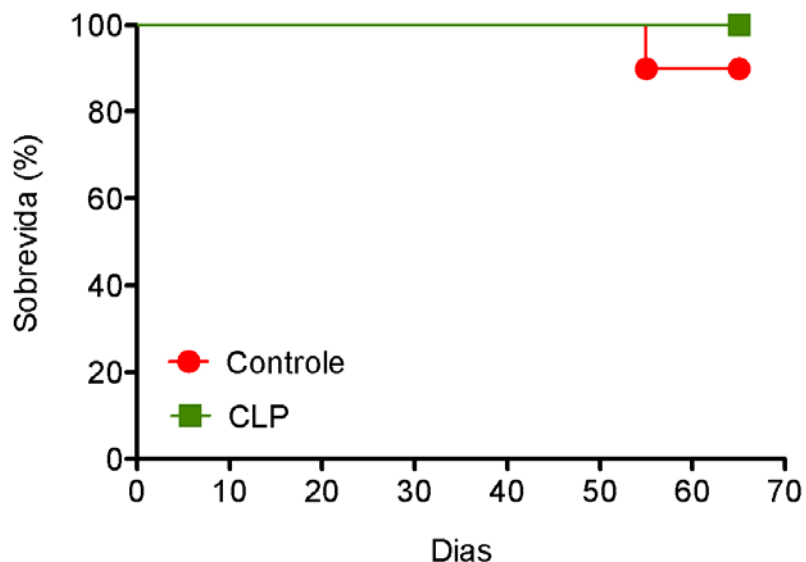
**Figura 12** - Sobrevida dos animais submetidos ao protocolo de CLP. Curvas calculadas pelo método de Kaplan-Meier. Valores expressos em %, n=4.

Durante o protocolo de indução de câncer colorretal por azoximetano e dextran foi registrada a curva ponderal de todos os animais. Como mostrado na Figura 1, os animais controle e pós-sepse apresentaram redução de peso durante os tratamentos com dextran, e ambos os grupos tiveram ganho de peso semelhante após cessar a ingestão de dextran nos dois primeiros ciclos. Contudo, após o último ciclo há uma diferença significativa entre a média de peso dos dois grupos (Figura 13), não havendo diferença entre o peso dos animais pós-sepse e animais *naive* ao final do protocolo.



**Figura 13** - Variação temporal do peso durante o protocolo de iniciação tumoral colorretal com AOM/DSS. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores dos pesos dos animais em g. Grupos: *naive*, controle AOM/DSS (AOM 10 mg/kg i.p. e DSS 2% v.o.), pós-sepse AOM/DSS (CLP e AOM 10 mg/kg i.p. e DSS 2% v.o.), n=10/grupo. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$  vs controle e AOM/DSS CLP.

Durante o protocolo, foi evidenciado que a sobrevivência dos animais dos grupos controle e pós-sepse é semelhante como demonstra a Figura 14.

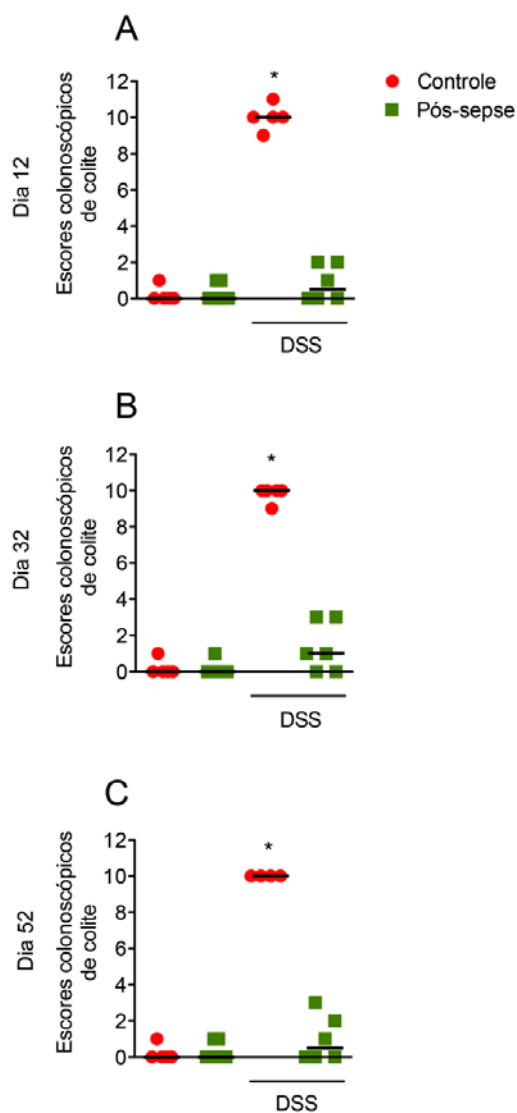


**Figura 14** - Sobrevivência dos animais submetidos ao protocolo de iniciação tumoral colorretal com AOM/DSS. Curvas calculadas pelo método de Kaplan-Meier. Valores expressos em %, n=10/grupo.

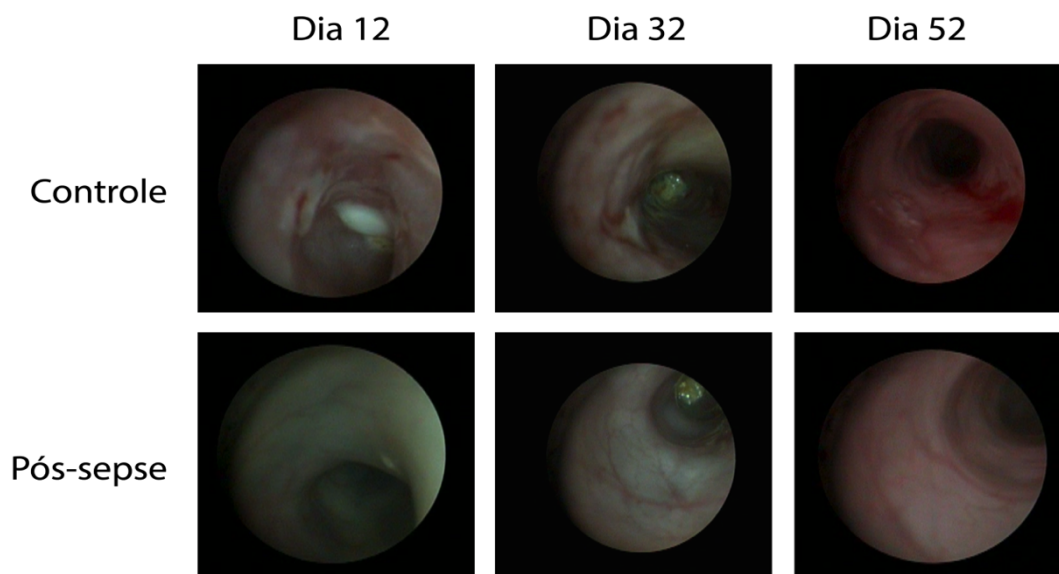
Nos dias 12, 32 e 52 do protocolo, logo após os ciclos de DSS, foram feitas análises por colonoscopia dos animais (Figuras 15 e 16) e ficou evidente que houve uma colite mais pronunciada nos animais controle comparados com os animais pós-sepse que receberam AOM/DSS. Além disso, não houve diferença nos valores de escores entre os animais pós-sepse que receberam AOM/DSS e os animais controle e pós-sepse que receberam apenas água.

Além disso, foi analisado o comprimento dos cólons dos animais controle, pós-sepse e animais controle não submetidos ao protocolo

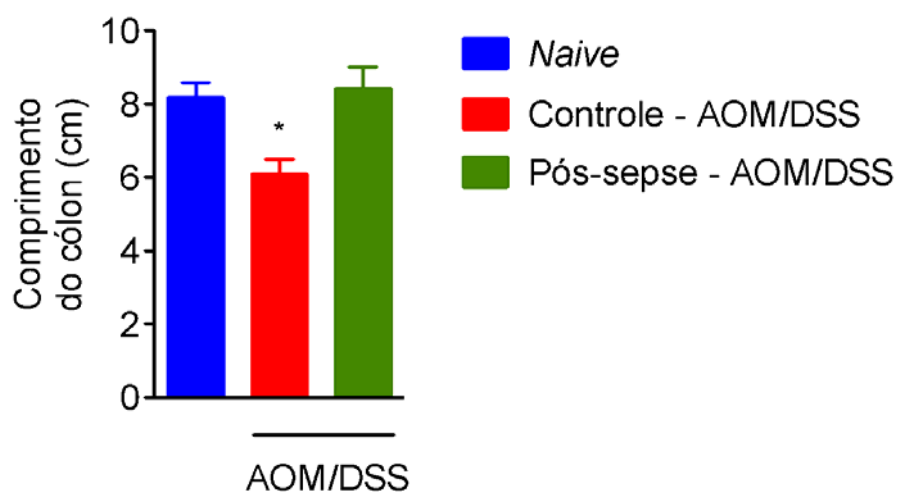
AOM/DSS. Observou-se que os animais controle apresentaram redução significativa no comprimento dos cólons em comparação aos animais pós-sepse e aos animais *naive* (Figura 17).



**Figura 15** - Escores colonoscópicos de classificação de colite durante o protocolo AOM/DSS. Observa-se colite mais intensa no grupo controle que recebeu DSS em relação aos demais grupos nos dias 12 (A), 32 (B) e 52 (C). Os valores da figura representam a mediana dos valores dos escores colonoscópicos de colite. Grupos: controle que receberam água, pós-sepse que receberam água, controle que receberam AOM/DSS, pós-sepse que receberam AOM/DSS. Comparação feita pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. \* $p < 0,05$  vs pós-sepse DSS.

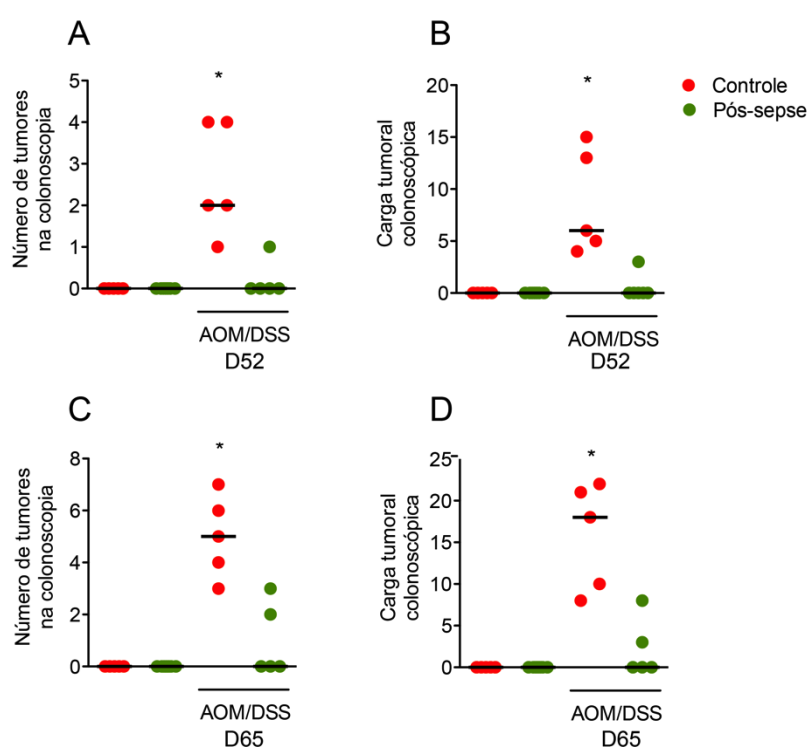


**Figura 16** - Fotografias representativas com visão endoscópica de cólons de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS. O cólon dos animais controle apresenta maior colite (com espessamento, úlceras e sangramento) quando comparado aos de animais pós-sepse.

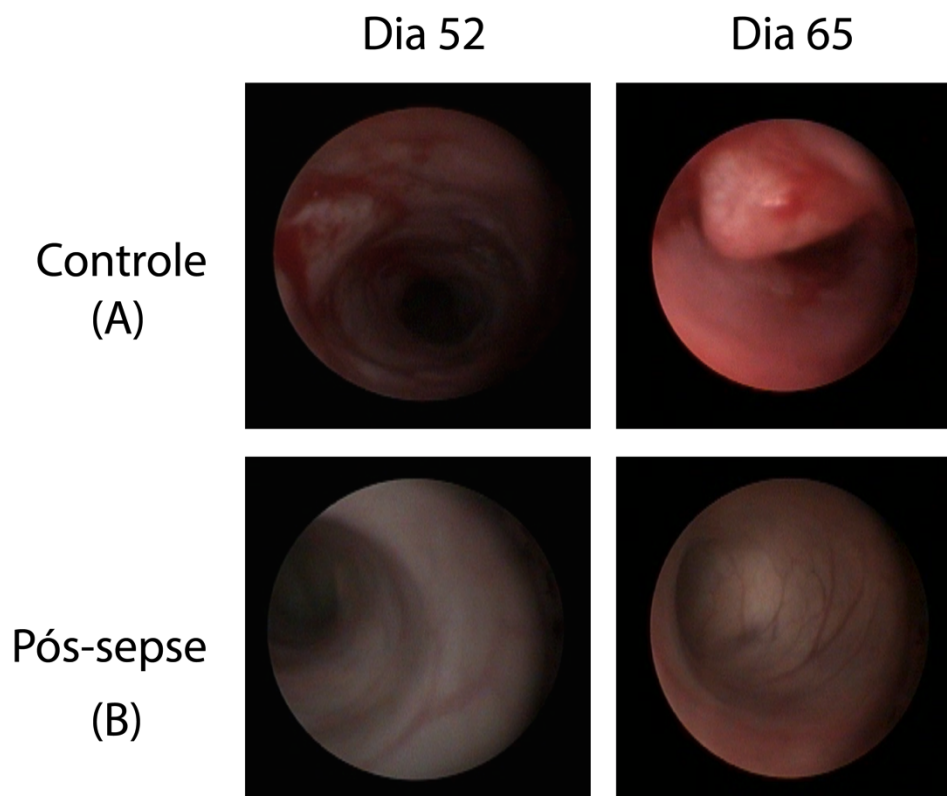


**Figura 17** - Média do comprimento dos cólons dos animais submetidos ao protocolo AOM/DSS. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do comprimento dos cólons em cm. Grupos: *naive*, AOM/DSS *controle*, AOM/DSS CLP,  $n=10$ /grupo. Comparação feita pelo teste ANOVA, seguido de correção de Bonferroni.  $*p < 0,05$  vs *naive* e pós-sepse.

Nas Figuras 18A, 18B e 19A, fica demonstrado que alguns animais já apresentam tumores visíveis na colonoscopia logo após o terceiro ciclo, no dia 52, e os animais controle tem um maior número de tumores e uma maior carga tumoral. Com o decorrer do seguimento, no dia 65, os animais controle permanecem com maior número de tumores e carga tumoral que os animais pós-sepse (Figuras 18C 18D e 19B).

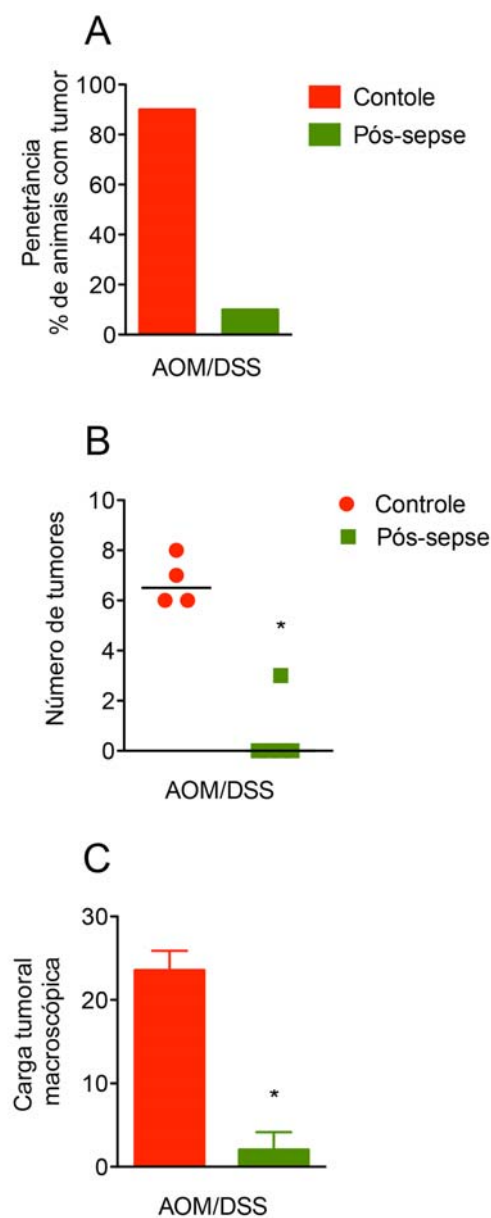


**Figura 18** - Número de tumores e carga tumoral colonoscópica de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS. Maior número de tumores e carga tumoral nos animais controle que foram submetidos ao AOM/DSS nos dias 52 (A e B) e 65 (C e D). Os valores da figura representam a mediana dos valores de números de tumores ou de carga tumoral. Grupos: controle que receberam água, pós-sepse que receberam água, controle que receberam AOM/DSS, pós-sepse que receberam AOM/DSS. Comparação feita pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. \* $p < 0,05$  vs controle água.



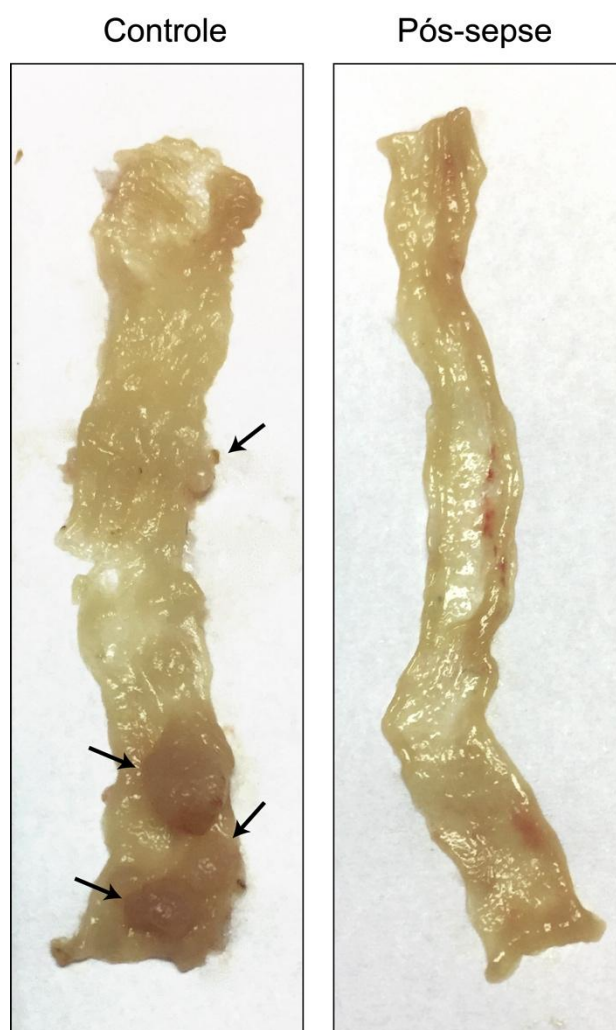
**Figura 19** - Fotografias representativas com visão endoscópica de cólons de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS. O cólon dos animais controle apresenta maior número de tumores e maior carga tumoral de forma mais precoce que dos animais pós-sepse.

Como se pode observar na Figura 20A, dentre os animais controle, 90% apresentaram tumores colorretais macroscópicos, enquanto apenas 10% dos animais pós-sepse desenvolveram tumores. Macroscopicamente, houve uma maior quantidade de tumores nos animais controle e uma maior carga tumoral (Figura 20C) em comparação com os animais pós-sepse (Figura 20B e 21).



**Figura 20** - Porcentagem de animais que desenvolveram tumores colorretais macroscopicamente e quantidade de tumores por animal. Os valores da figura 7A representam a média das porcentagens e da figura 7B representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores da multiplicidade dos tumores e a figura 7C a carga tumoral (soma dos diâmetros dos tumores). Grupos: controle AOM/DSS, pós-sepse AOM/DSS, n=10 ou 5/grupo. Comparação feita pelo teste t de Student. \* $p < 0,05$  vs controle.





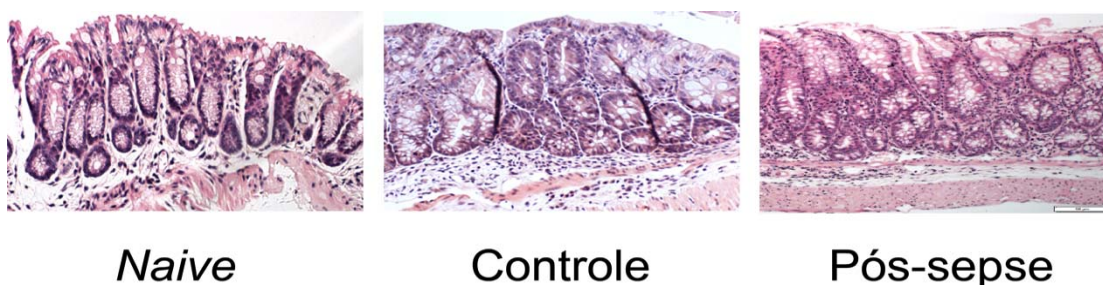
**Figura 21** - Fotografias representativas com visão macroscópica de cólons de animais submetidos ao protocolo de iniciação tumoral. Tumores estão indicados por setas. O cólon do animal controle apresenta tumores visíveis macroscopicamente e tem um menor tamanho quando comparado ao cólon do animal pós-CLP.

Posteriormente, os cólons foram processados e corados por HE (hematoxilina-eosina) para análise microscópica por patologista. Dentre os animais controle, todos apresentaram adenoma ou adenocarcinoma, por

outro lado, os animais pós-sepse não apresentaram adenocarcinoma (Tabela 1 e Figura 22).

**Tabela 1** - Análise histopatológica das amostras dos cólons quanto a identificação de malignidade (n=5/grupo).

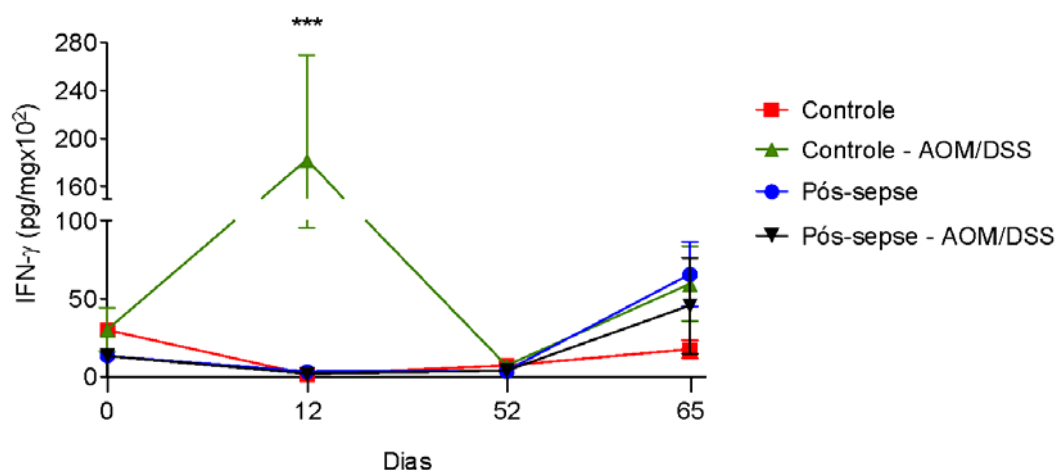
	Mucosa Normal	Pólipo	Adenoma de baixo grau	Adenoma	Adenocarcinoma
<b>Controle</b>	0%	0%	0%	50%	50%
<b>Pós-sepse</b>	25%	50%	25%	0%	0%



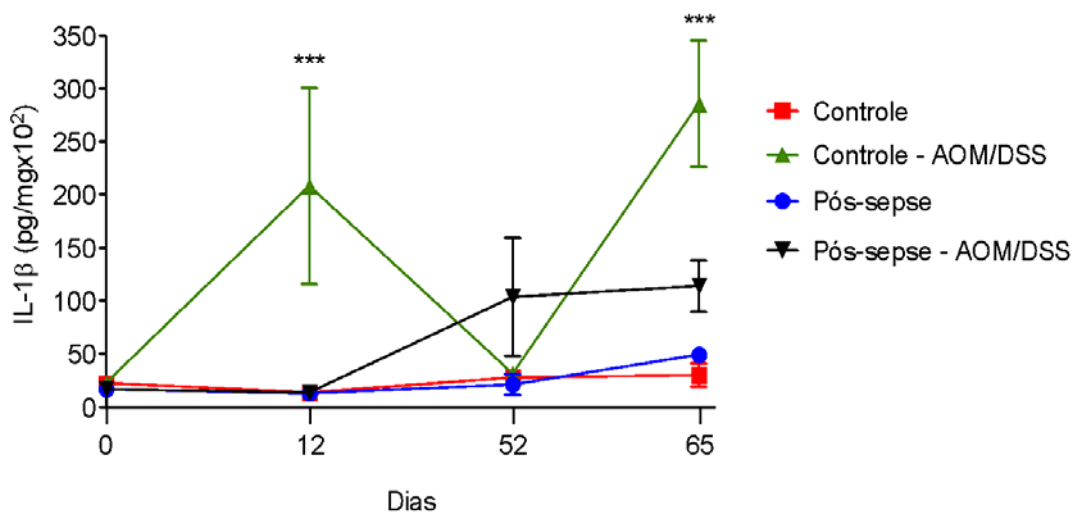
**Figura 22** - Fotomicrografias representativas com visão das camadas do cólon de animais submetidos ao protocolo AOM/DSS. O cólon do animal controle apresenta tumores evidentes.

Com o objetivo de identificar o momento no qual algumas citocinas e quimiocinas poderiam estar modificadas de forma a influenciar o desenvolvimento do CAC, grupos de animais controle e pós-sepse foram eutanasiados nos tempo 0, 12, 52 e 65. Os níveis de, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-17, IL-13, IL-23, IL-33, TGF- $\beta$ , KC, MIG e GM-CSF foram quantificados nos cólons. Esse experimento mostrou que houve um aumento significativo de IFN- $\gamma$  no cólon dos animais controle submetidos ao protocolo AOM/DSS no dia 12 (Figura 23), de IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-17, KC e MIG nos dias 12 e 65

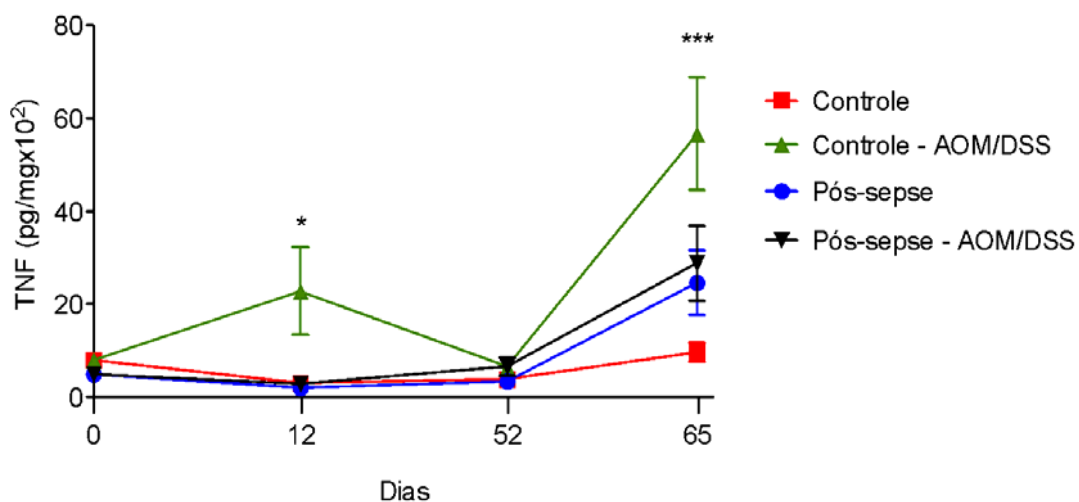
(Figuras 24, 25, 26, 27, 28 e 29), e de IL-33, TGF- $\beta$  e GM-CSF no dia 65 (Figuras 30, 31, 32). Foi mostrado também um aumento de IL-23 nos animais pós-sepse que receberam AOM/DSS no dia 65 em comparação a animais controle (Figuras 33 e 34).



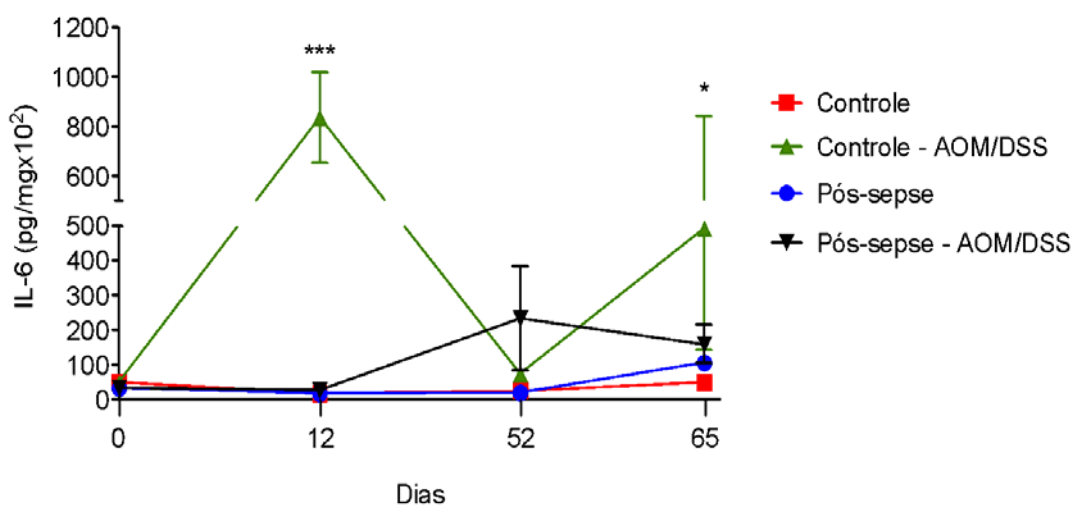
**Figura 23** - Dosagem de IFN- $\gamma$  do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de IFN- $\gamma$  (pg/mg de tecido x 10<sup>2</sup>) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=5/grupo. Os valores significativos tinham \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,0001.



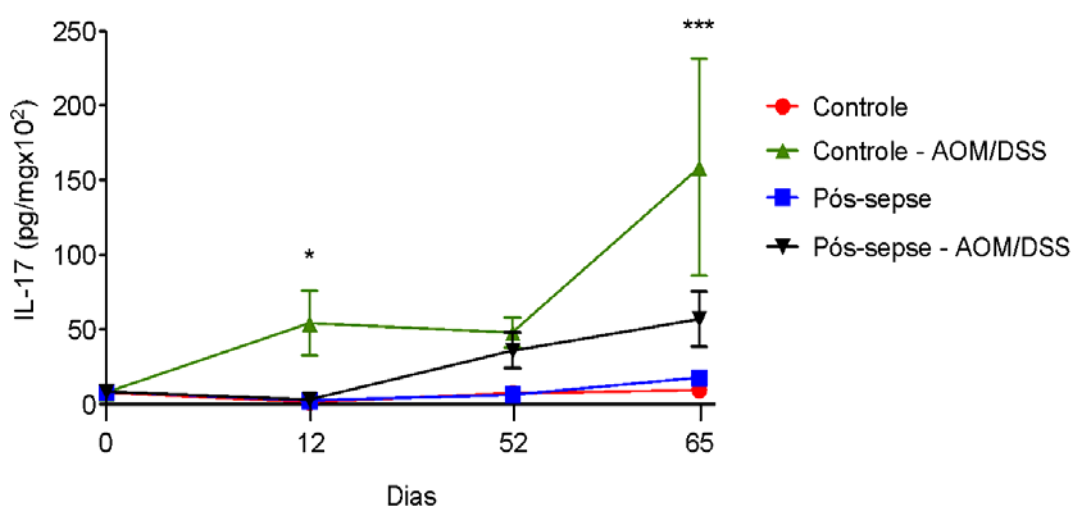
**Figura 24** - Dosagem de IL-1 $\beta$  do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de IL-1 $\beta$  (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=5/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05, \*\*\*p<0,0001.



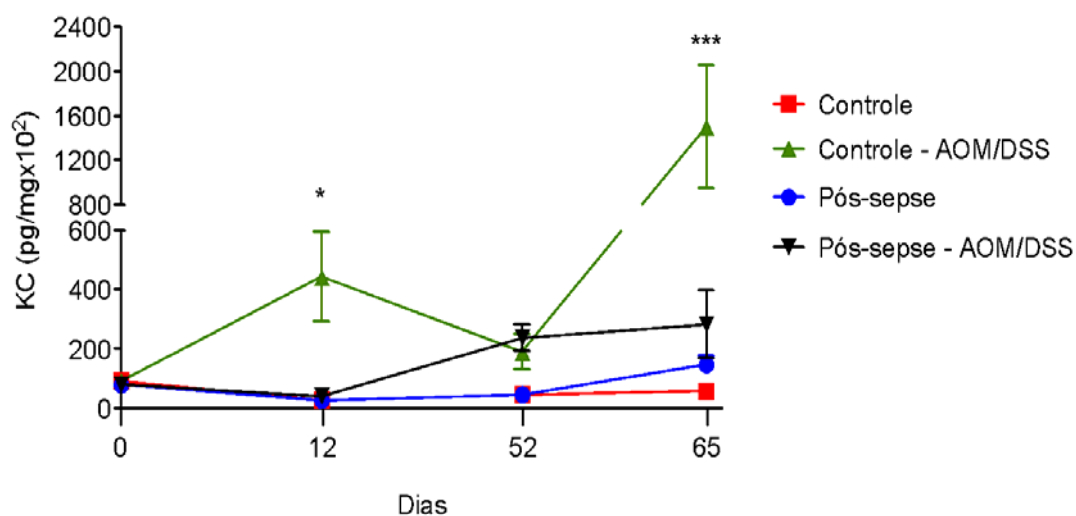
**Figura 25** - Dosagem de TNF do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de TNF (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. n=5/grupo. Os valores significativos tinham \*p< 0,05, \*\*\*p<0,0001.



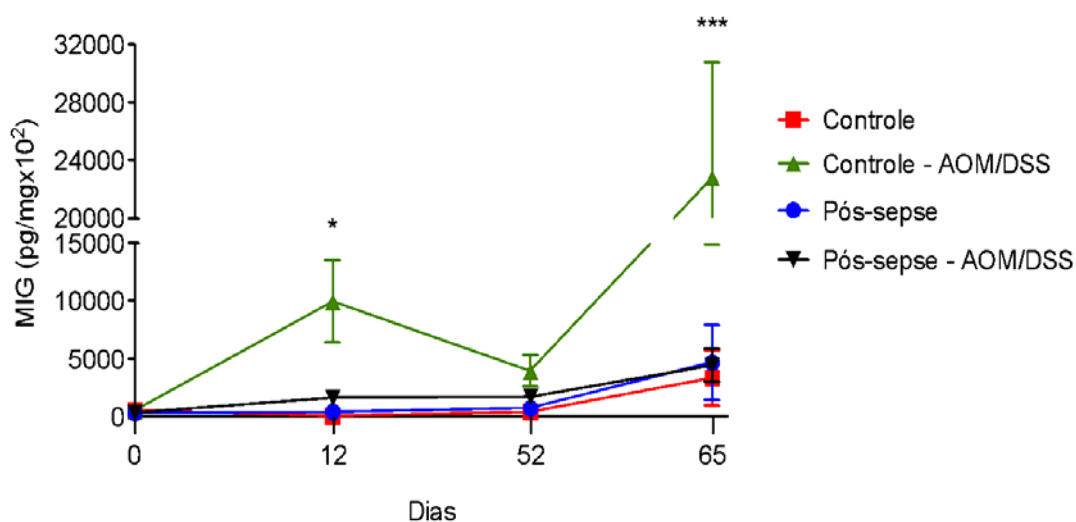
**Figura 26** - Dosagem de IL-6 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de IL-6 (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,0001$ .



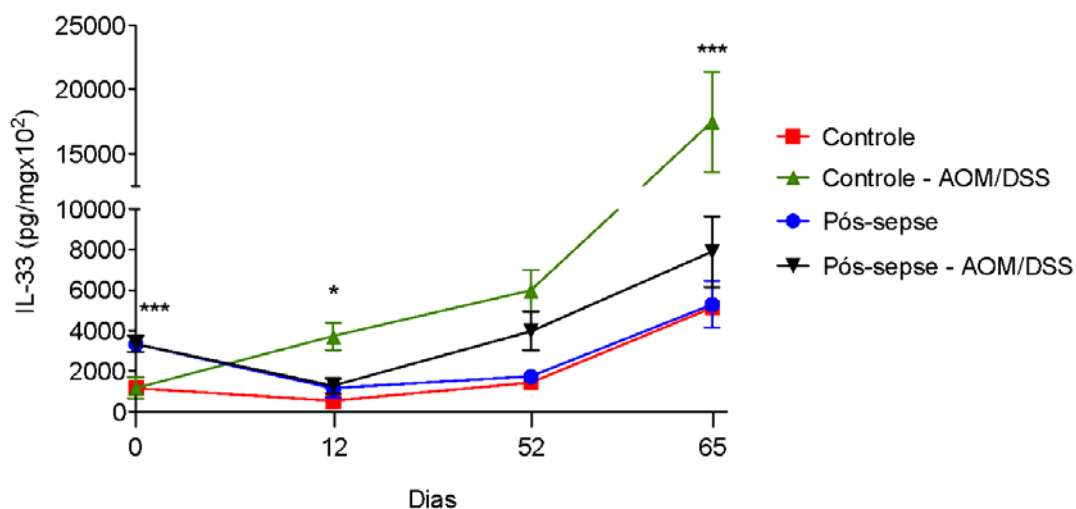
**Figura 27** - Dosagem de IL-17 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de IL-17 (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,0001$ .



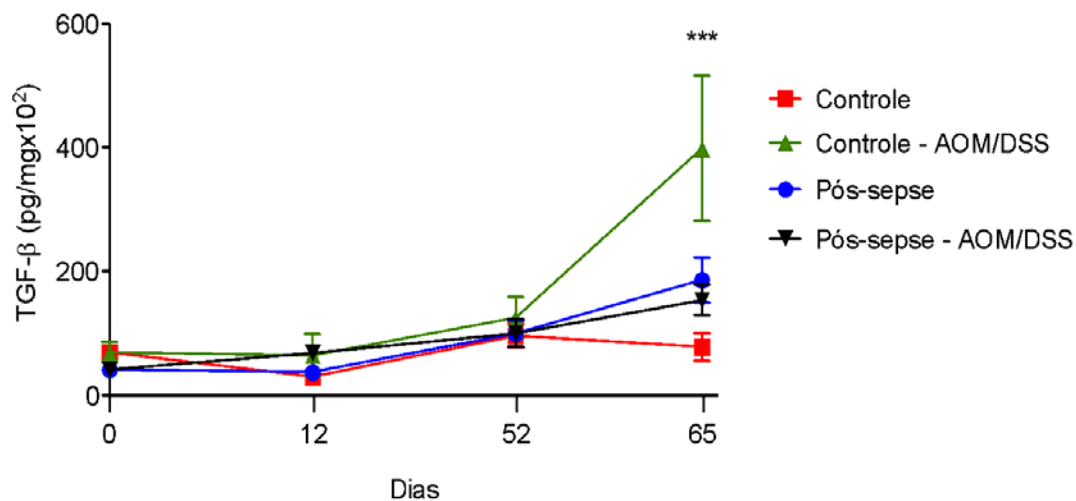
**Figura 28** - Dosagem de KC do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de KC (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,0001$ .



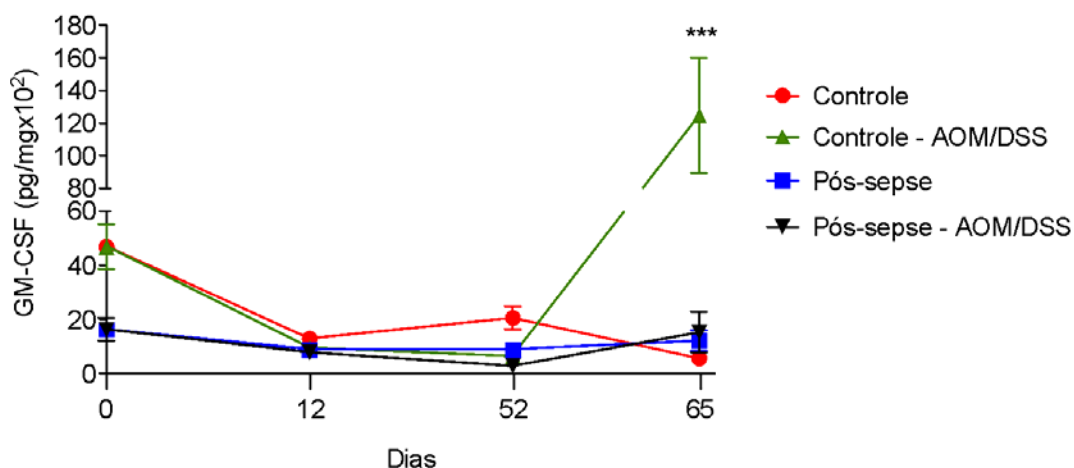
**Figura 29** - Dosagem de MIG do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de MIG (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,0001$ .



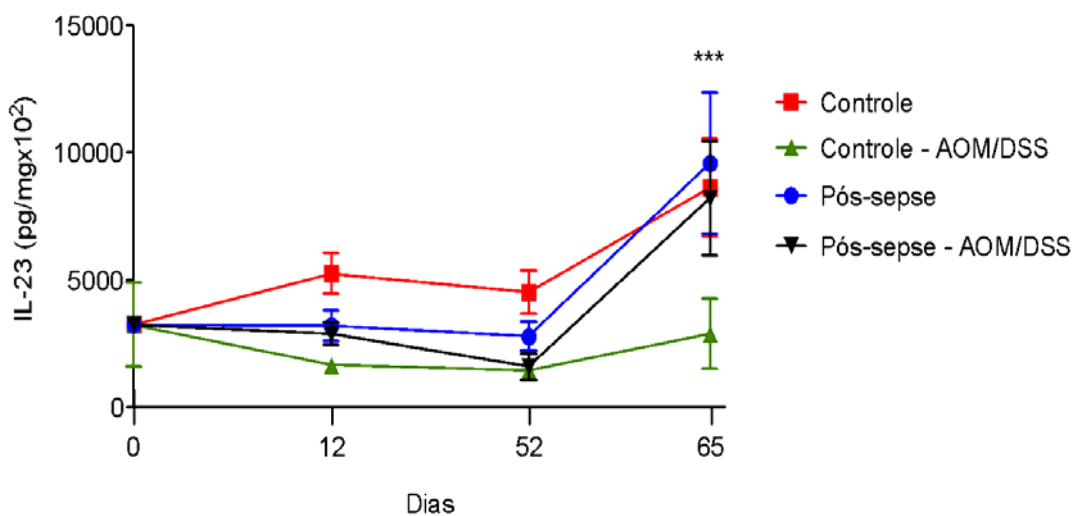
**Figura 30** - Dosagem de IL-33 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de IL-33 (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,0001$ .



**Figura 31** - Dosagem de TGF- $\beta$  do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de TGF- $\beta$  (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $***p < 0,0001$ .



**Figura 32** - Dosagem de GM-CSF do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de GM-CSF (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,0001$ .

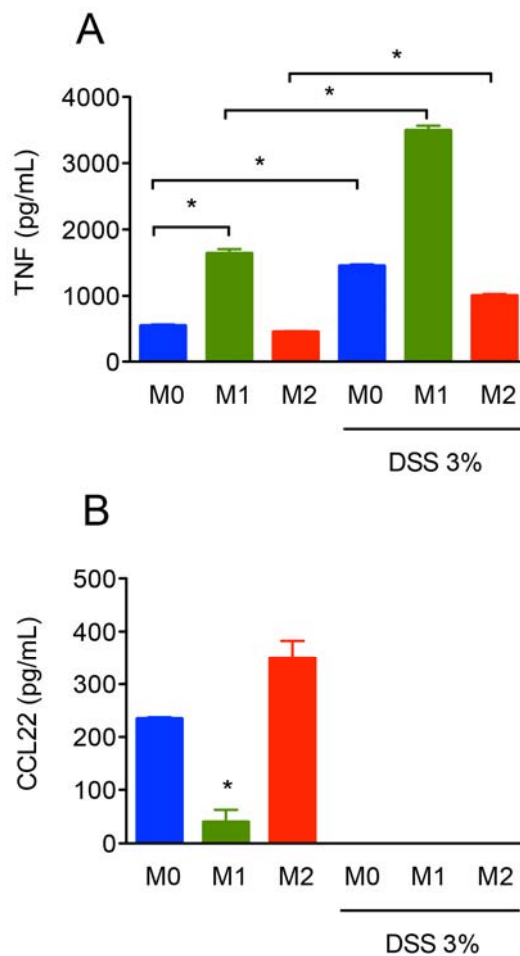


**Figura 33** - Dosagem de IL-23 do cólon de camundongos controle e pós-sepse, que foram ou não submetidos ao protocolo AOM/DSS nos dias 0, 12, 52 e 65. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de IL-23 (pg/mg de tecido  $\times 10^2$ ) nos dias 0, 12, 52 e 65. Comparação feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=5$ /grupo. Os valores significativos tinham  $***p < 0,0001$ .

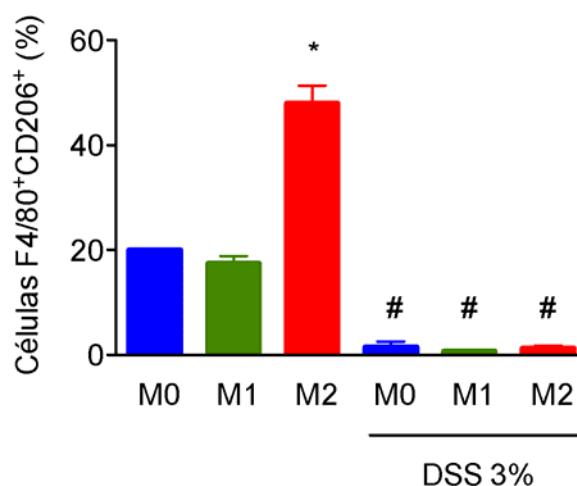


## **5.2 CULTURA DE CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS**

Na tentativa de estudar os mecanismos celulares pelos quais atua o DSS, foi realizada cultura de macrófagos provenientes da medula óssea, que foram tratados com LPS ou IL-4 para aquisição de perfil M1 ou M2, respectivamente. Com isso, os macrófagos diferenciados foram expostos a uma solução com 3% de DSS para analisar se o DSS seria capaz de alterar o perfil dessas células. Foi observado que o DSS é capaz de polarizar células M0 e M2 para um perfil M1, com maior produção de TNF, menor produção de CCL22 (Figura 34) e com uma menor quantidade de células expressando CD206 na membrana (Figura 35).

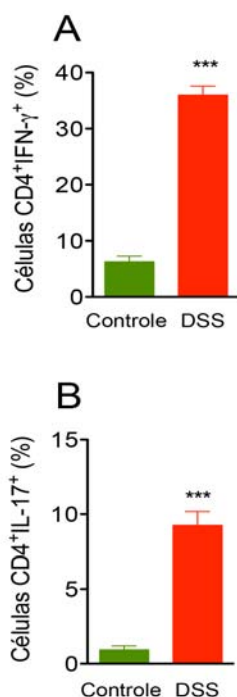


**Figura 34** - Quantidade de citocinas/ml produzidas pelos macrófagos. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de quantidade de TNF (A), CCL22 (B) por ml (pg/ml). Grupos: M0, M1, M2. Comparação entre os grupos feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=2$ , feito em triplicata. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$ .



**Figura 35** - Porcentagem de células F4/80+CD206+ (M2) no total de células. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores da porcentagem de células. Grupos: M0, M1, M2. ANOVA seguida do teste de Bonferroni.  $n=2$ , feito em triplicata. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$  vs M0 e M1,  $\#p < 0,05$  vs M0, M1, M2.

Levando em consideração que as células dendríticas são essenciais para apresentar antígenos e produzir citocinas que polarizam células T, estas foram cultivadas juntamente a células T CD4 na presença ou não de DSS. Com isso, foi observado que as co-culturas expostas ao DSS apresentaram uma maior polarização para perfis antagônicos a células Treg, que são Th1 e Th17 (Figura 36).

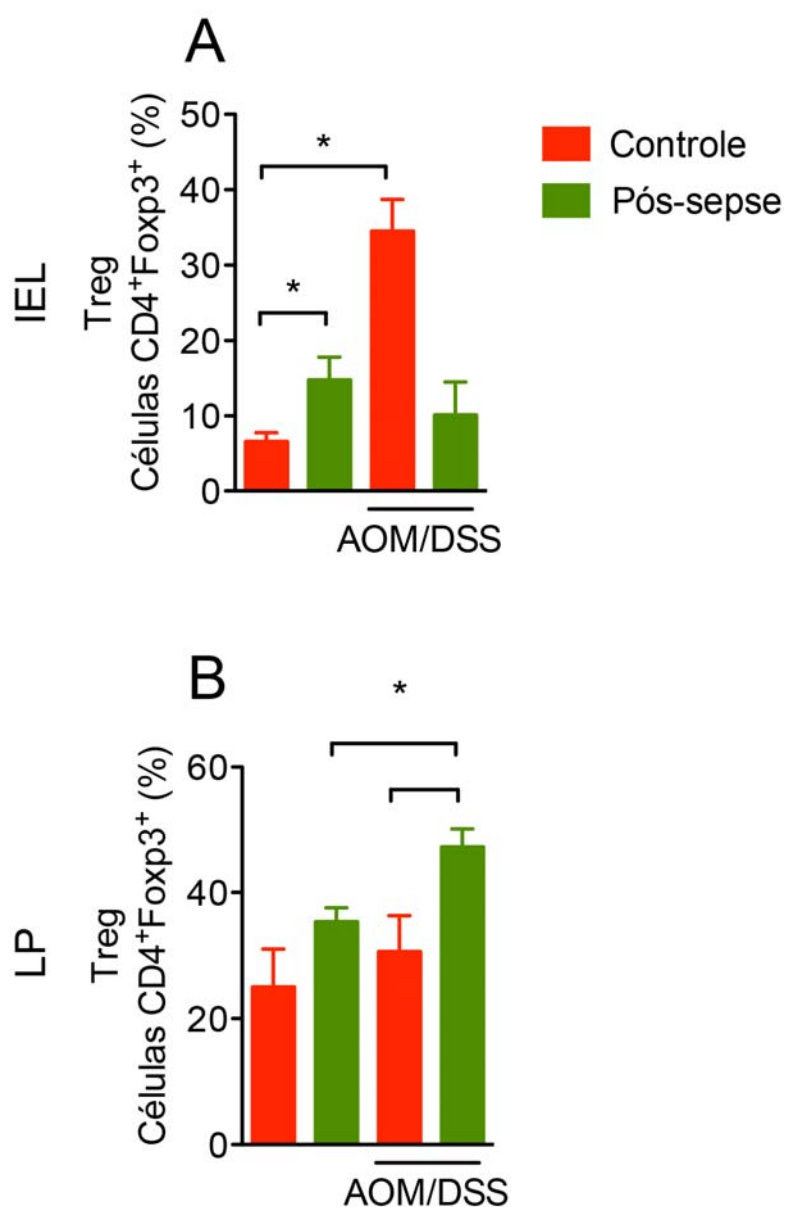


**Figura 36** - Porcentagem de células CD4+IFN-gama+ (Th1) e CD4+IL-17+ (Th17) no total de células. Os valores da figura representam as porcentagens de células Th1 e Th17 do valor total de linfócitos. Grupos: controle e DSS 1%. n=2, feito em triplicata. Os grupos foram comparados pelo teste t de Student. \*p< 0,001.

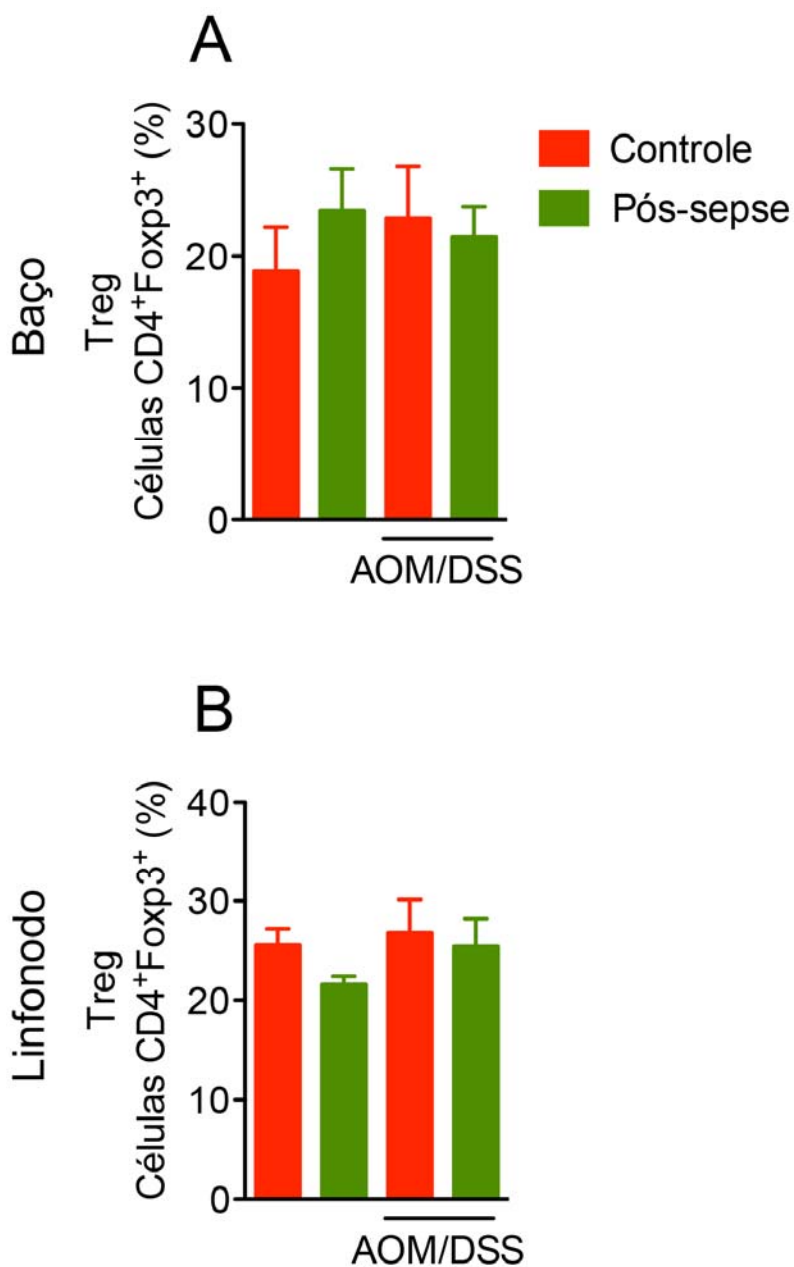
### 5.3 PAPEL DAS CÉLULAS TREG NA INICIAÇÃO TUMORAL DE ANIMAIS PÓS-SEPSE

Após o protocolo de iniciação tumoral colorretal, foi feito o processamento de linfonodos mesentéricos, baços e cólons dos animais para a análise da presença de células Treg através de citometria de fluxo. Como apresentado na figura 38, houve uma menor porcentagem de células Treg intraepiteliais (IEL) no cólon de camundongos pós-sepse quando comparado a animais controle. Por outro lado, aumento de Treg nas lâminas

próprias de animais pós-sepse que receberam o AOM/DSS (Figura 37). Fato este que não se refletiu em diferenças estatisticamente significativas no baço e linfonodo mesentérico (Figura 38).

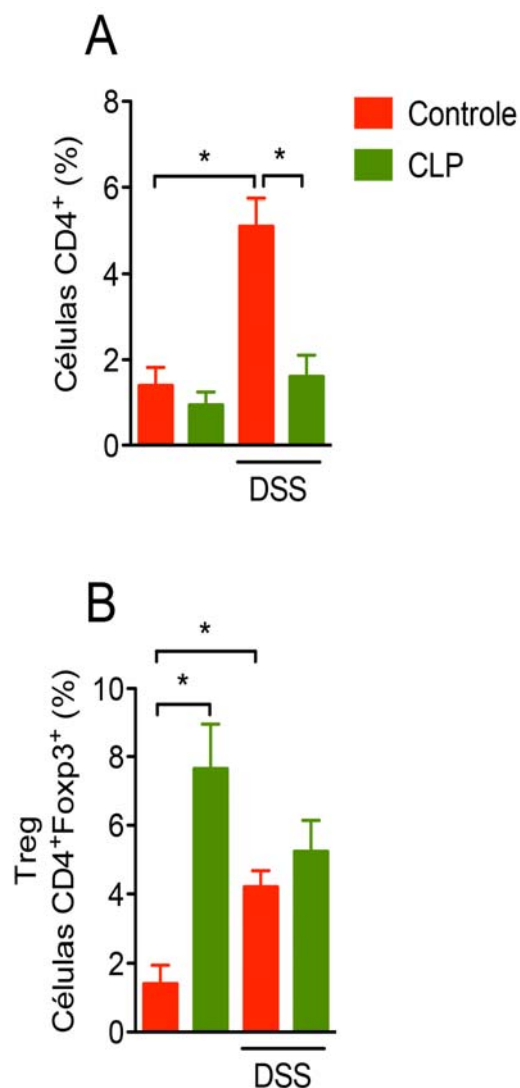


**Figura 37** - Porcentagem de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg) total de células mononucleares CD45<sup>+</sup> nos cólons (intraepiteliais e lâmina própria). Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores da porcentagem de células Foxp3 no *gate* de CD4 presentes nas células IEL e LP. Grupos: Controle e pós-sepse com e sem AOM/DSS. Comparação empregou ANOVA e teste t de *student*. \* $p < 0,05$  vs controle.



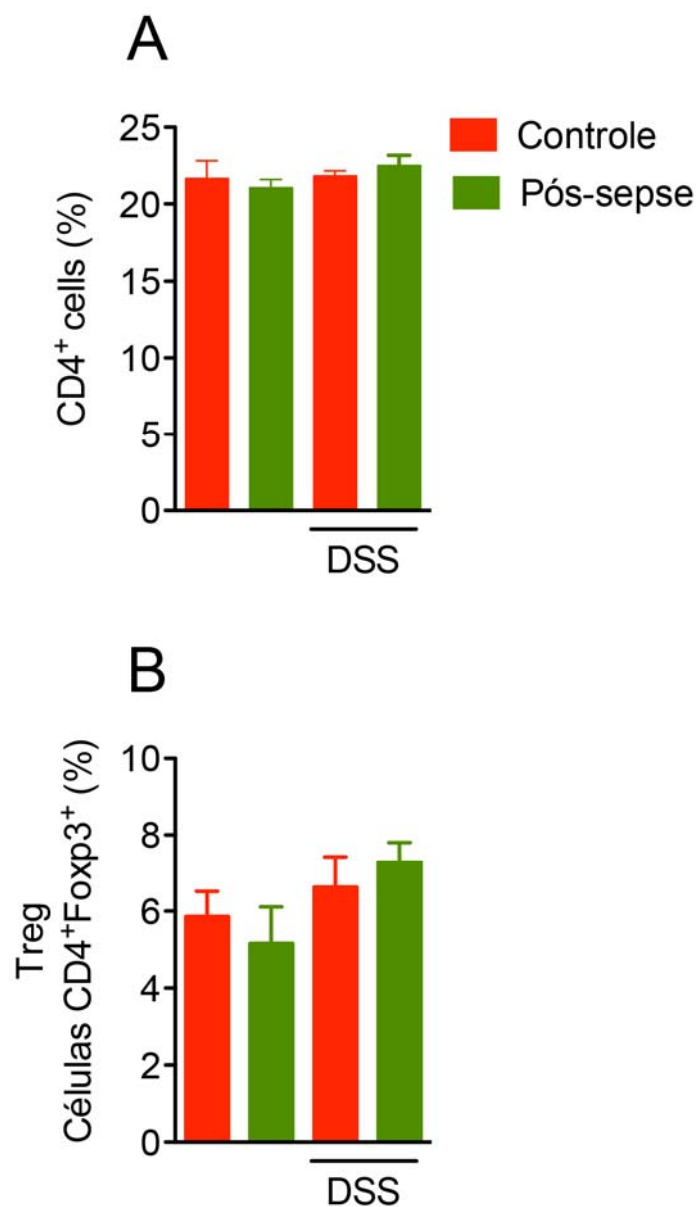
**Figura 38** - Porcentagem de células CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Treg) total de células mononucleares CD45<sup>+</sup> no baço e linfonodos mesentéricos. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores da porcentagem de células Foxp3 no *gate* de CD4 presentes nas células IEL e LP. Grupos: Controle e pós-sepse com e sem AOM/DSS. Comparação empregou ANOVA e teste t de *student*.

Logo após o primeiro ciclo de DSS, os animais foram eutanasiados e realizou-se o processamento de IEL e LP dos cólons dos animais para a análise da presença de células Treg através de citometria de fluxo. Como apresentado na figura 39, houve uma maior porcentagem de células Treg no cólon de camundongos pós-sepse quando comparado a animais controle sem o uso de DSS. Na Figura 40, estão demonstradas as contagens de células CD4 e Treg na lâmina própria, e ficou evidente que não houve diferença entre os grupos. Na Figura 41, estão expressos o número de macrófagos M2, 15 dias após a CLP.

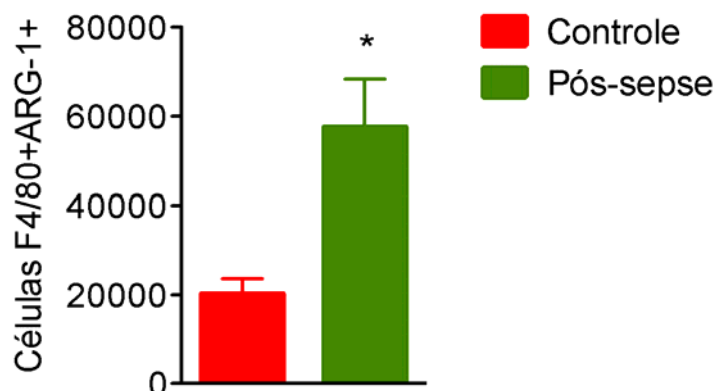


**Figura 39** - Porcentagem de células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no total de células mononucleares intraepiteliais dos cólons após um ciclo de DSS. Como mostrado na figura, há um maior número de células Treg nas IEL dos animais após CLP quando comparado aos animais controle. Quando é feito o ciclo de DSS esse valor é reduzido, por outro lado, os animais controle tem um aumento de Treg após o ciclo de DSS. Os valores da figura representam a média ± E.P.M. dos valores da porcentagem de células Foxp3 no *gate* de CD4 presentes nas células IEL. Grupos: controle e pós-sepse, DSS controle e DSS pós-sepse. A comparação empregou teste ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. \*p < 0,05 vs controle e pós-sepse.





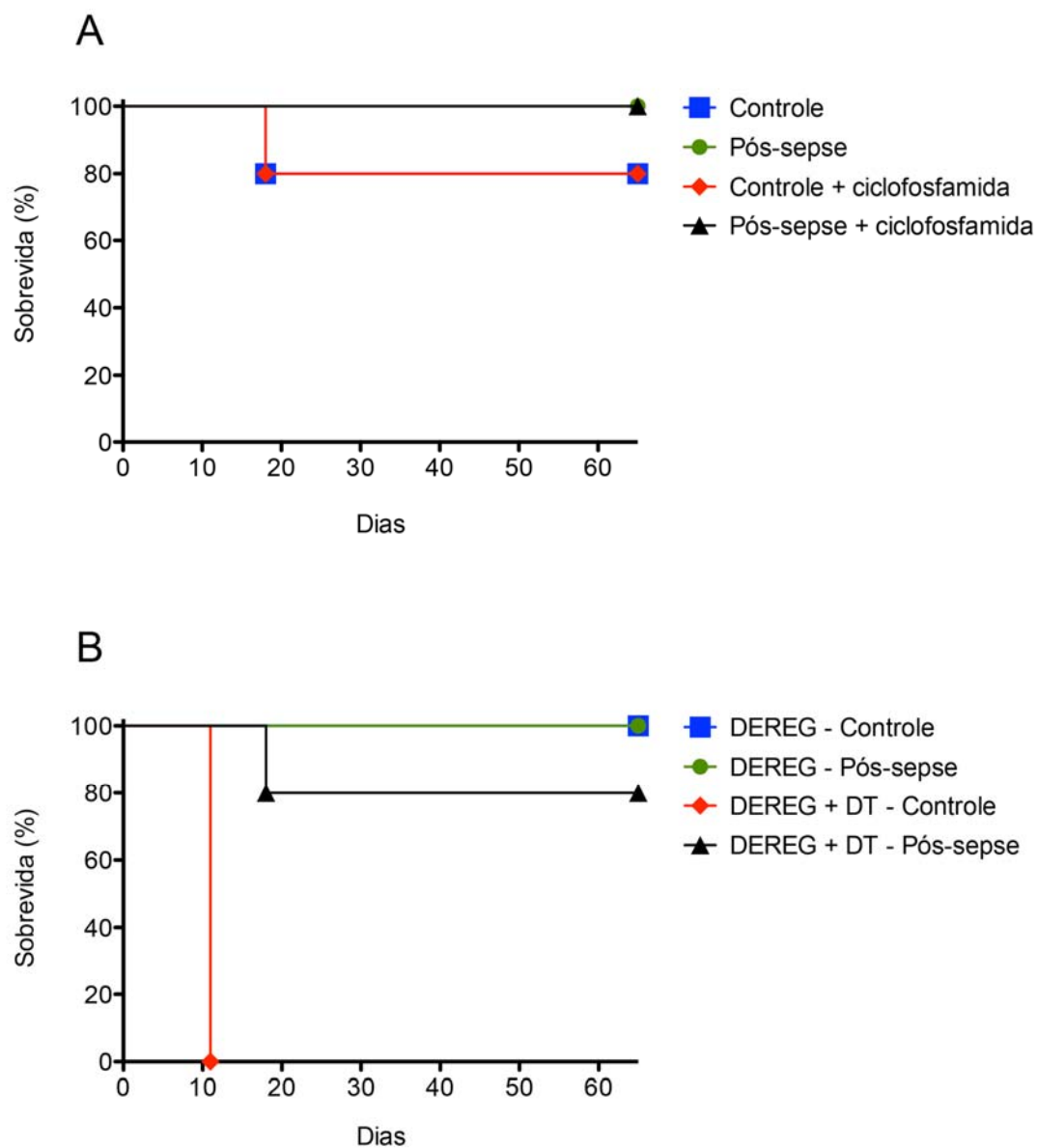
**Figura 40** - Porcentagem de células CD4<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> no total de células mononucleares na lâmina própria dos cólons após um ciclo de DSS. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores da porcentagem de células Foxp3 no *gate* de CD4 presentes nas células da LP. Grupos: controle e pós-sepse, DSS controle e DSS pós-sepse. A comparação empregou teste ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni.



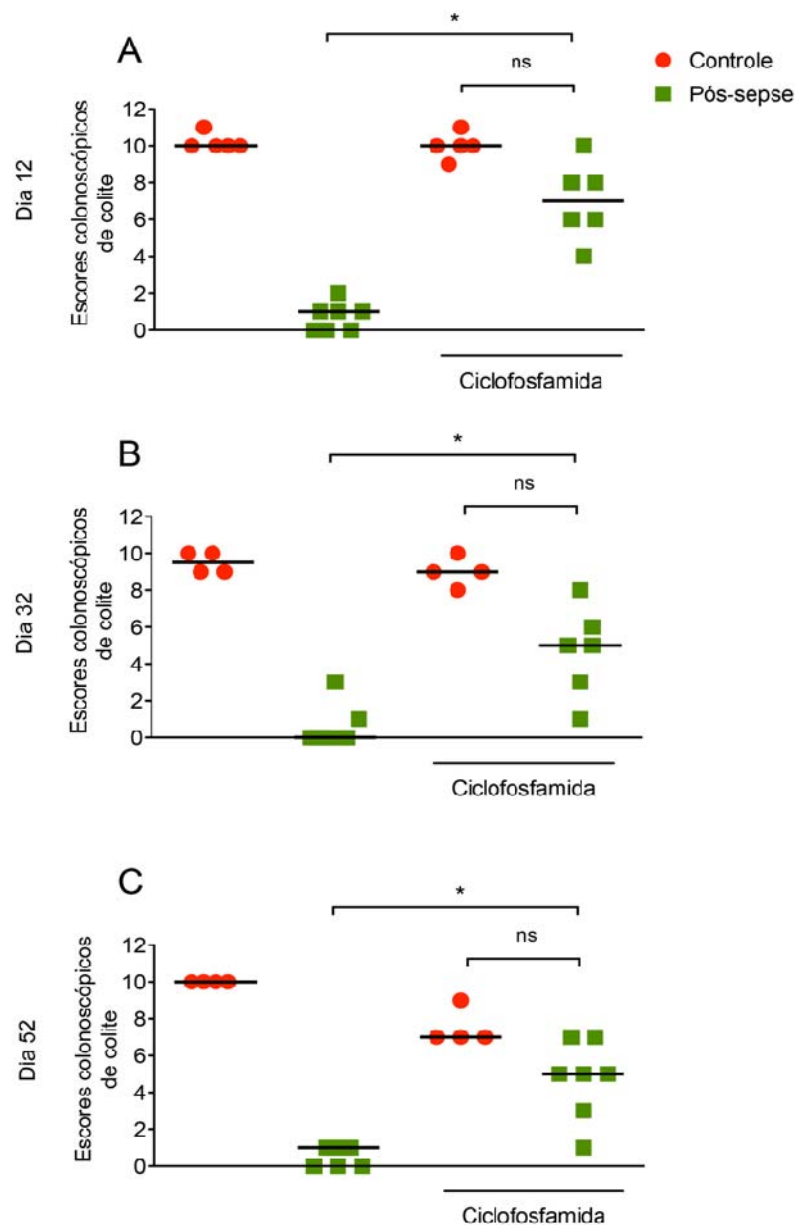
**Figura 41** - Número de macrófagos M2 F4/80+ARG1+ no total de células mononucleares na lâmina própria dos cólons 15 dias após CLP. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores da porcentagem de células F4/80 na *gate* de CD4 presentes nas células do cólon. Grupos: controle, pós-sepse. A análise estatística foi feita por teste t de student. \* $p < 0,05$  vs controle e CLP.

Com esses resultados, foi repetido o protocolo de sepse seguida pela iniciação tumoral e avaliado o impacto da redução do número de células Treg, com o uso de ciclofosfamida, ou da completa depleção dessas células, com o uso de toxina diftérica, empregando animais geneticamente modificados que possuem o gene do receptor dessa toxina acoplado ao gene *Foxp3* (DEREG).

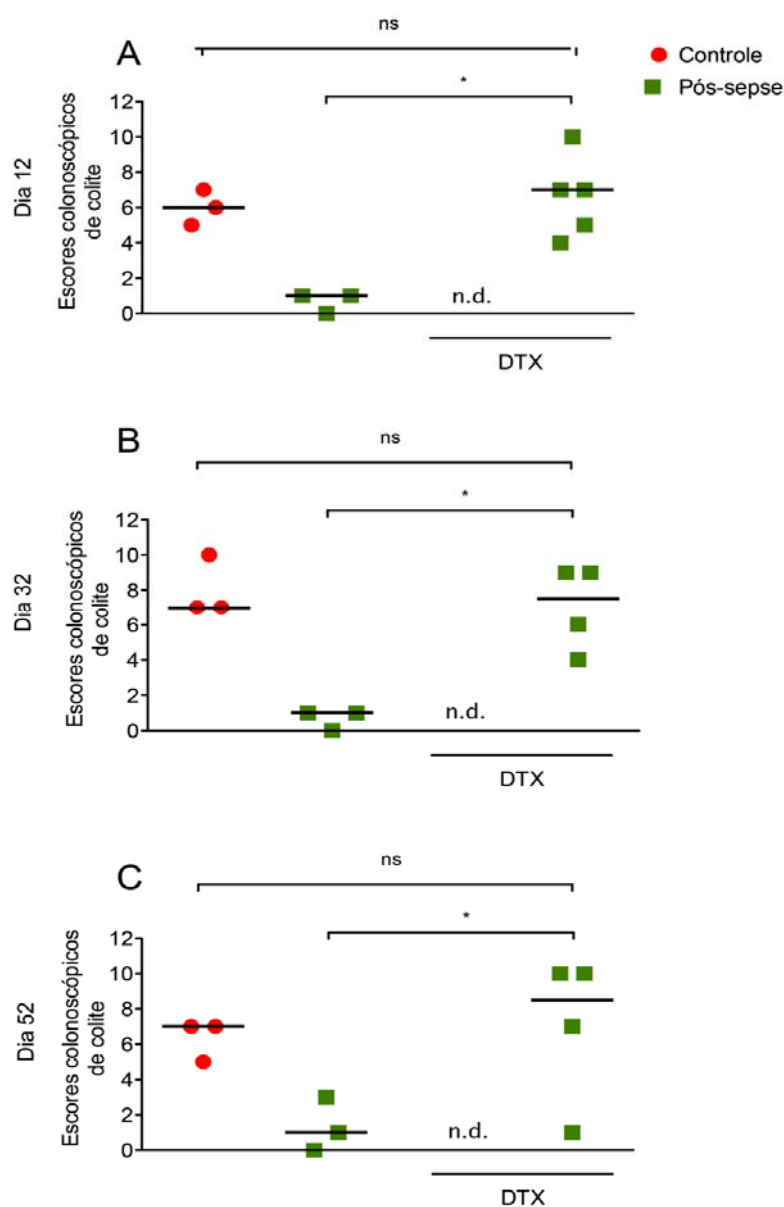
Inicialmente foi avaliada a sobrevivência desses animais e foi observado que houve uma maior mortalidade de animais DEREG controle que receberam a toxina (DTX) (Figura 42). Ficou demonstrado que houve também aumento significativo na colite dos animais pós-sepse que receberam a ciclofosfamida (Figura 43) ou a toxina diftérica (Figura 44) nos dias D12, D32 e D52 quando comparados aos animais pós-sepse que receberam apenas o DSS.



**Figura 42** - Sobrevida dos animais WT que receberam ciclofosfamida (A) e DEREK que recebem toxina diftérica (DTX) (B) e que foram submetidos ao protocolo de iniciação tumoral colorretal com AOM/DSS. Valores expressos em porcentagem (%). As curvas de sobrevivência foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier.

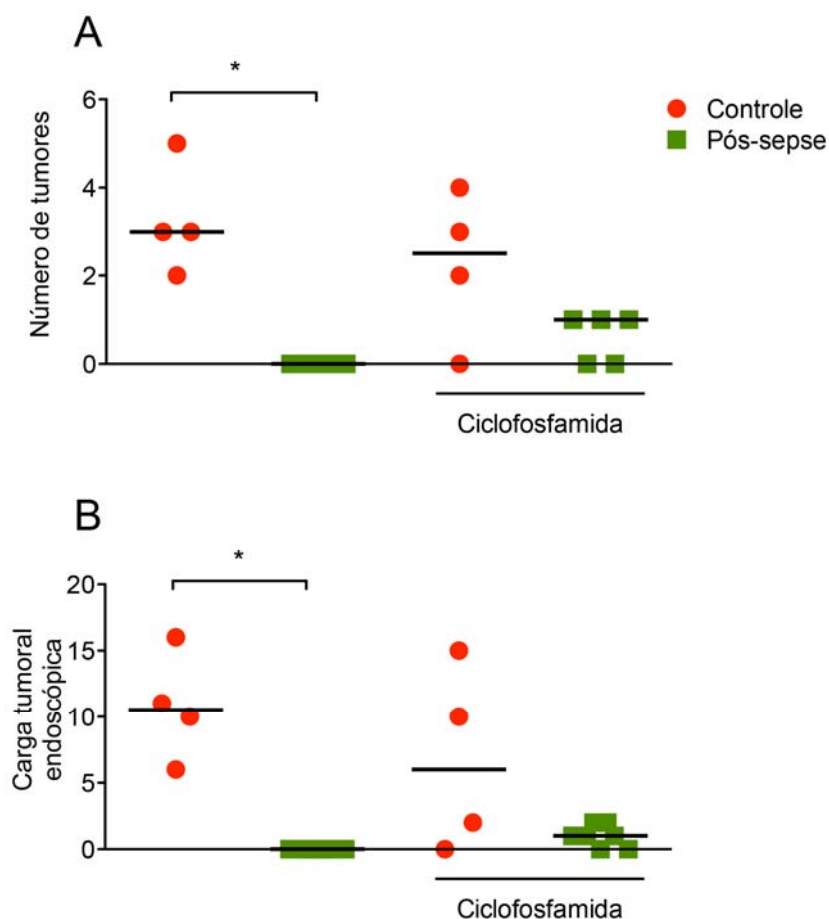


**Figura 43** - Escores colonoscópicos de colite após tratamento com ciclofosfamida. Evidencia-se maior intensidade da colite nos animais pós-sepse que receberam DSS e ciclofosfamida em comparação aos animais pós-sepse que receberam apenas DSS. Os valores da figura representam a mediana dos valores dos escores de colite. Grupos: *controle* que receberam água, CLP que receberam água, *controle* que receberam DSS, CLP que receberam DSS, *controle* e CLP que receberam ciclofosfamida. A empregou o teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. \* $p < 0,05$  Ciclofosfamida pós-sepse vs controle pós-sepse.

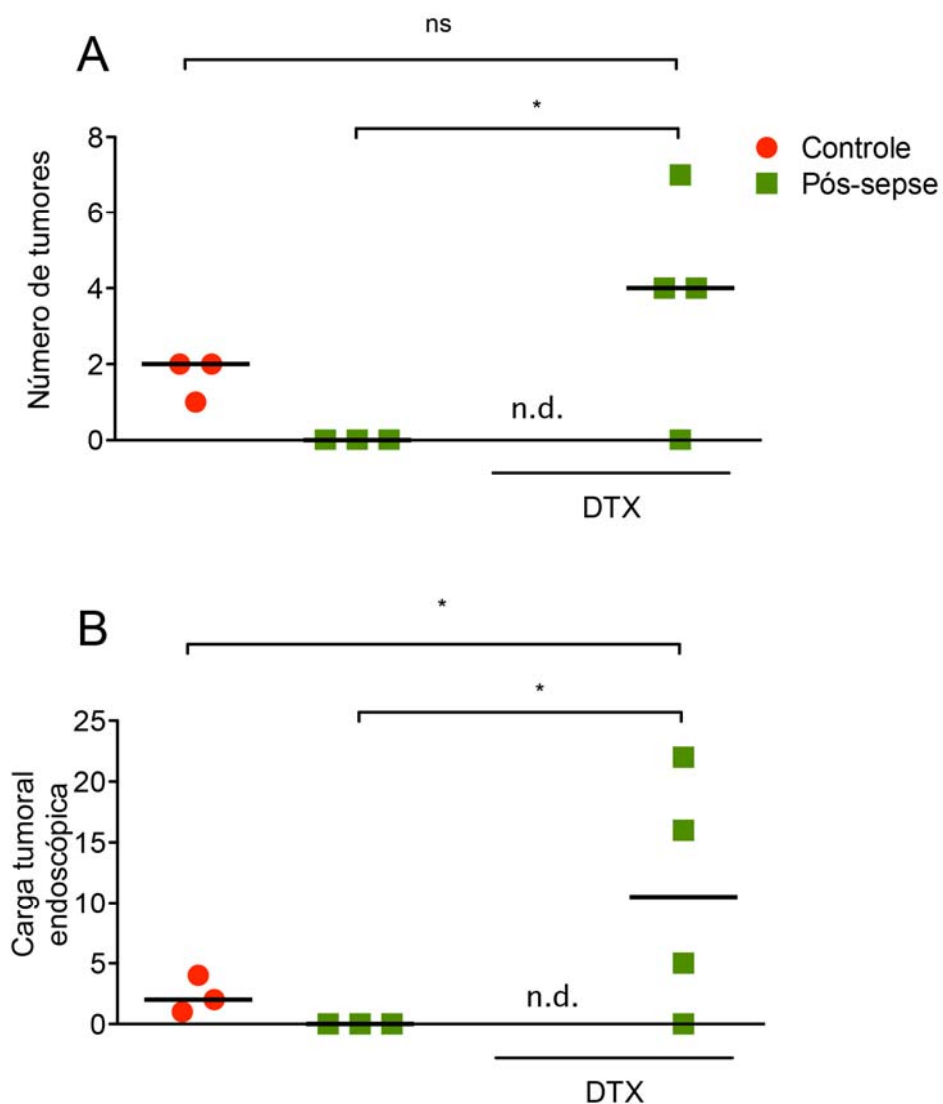


**Figura 44** - Escores colonoscópicos de colite após tratamento de animais DEREg com toxina diftérica. Evidencia-se maior intensidade da colite nos animais pós-sepse que receberam DSS e toxina diftérica em comparação aos animais pós-sepse que receberam apenas DSS. Os valores da figura representam a mediana dos valores dos escores de colite. Grupos: *controle* que receberam água, CLP que receberam água, *controle* que receberam DSS, CLP que receberam DSS, *controle* e CLP que receberam DTX. A comparação empregou o teste Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn. \* $p < 0,05$  DTX pós-sepse vs controle pós-sepse (n.d. não determinado devido morte antes da avaliação). DTX – toxina diftérica.

Ao final do terceiro ciclo, foi possível detectar a quantidade de tumores e a carga tumoral presentes no cólon dos animais submetidos ao protocolo com ciclofosfamida (Figura 45) e com a toxina diftérica (Figura 46).



**Figura 45** - Número de tumores e da carga tumoral por colonoscopia após tratamento com ciclofosfamida. Observou-se número de tumores e carga tumoral semelhantes no dia 52 entre os grupos que receberam ciclofosfamida. Os valores da figura representam a mediana dos valores de números de tumores ou de carga tumoral. Grupos: controle que receberam AOM/DSS, pós-sepse que receberam AOM/DSS, controle que receberam AOM/DSS + ciclofosfamida, pós-sepse que receberam AOM/DSS + ciclofosfamida. Comparação empregou teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. \* $p < 0,05$  Controle sem sepse vs controle pós-sepse.

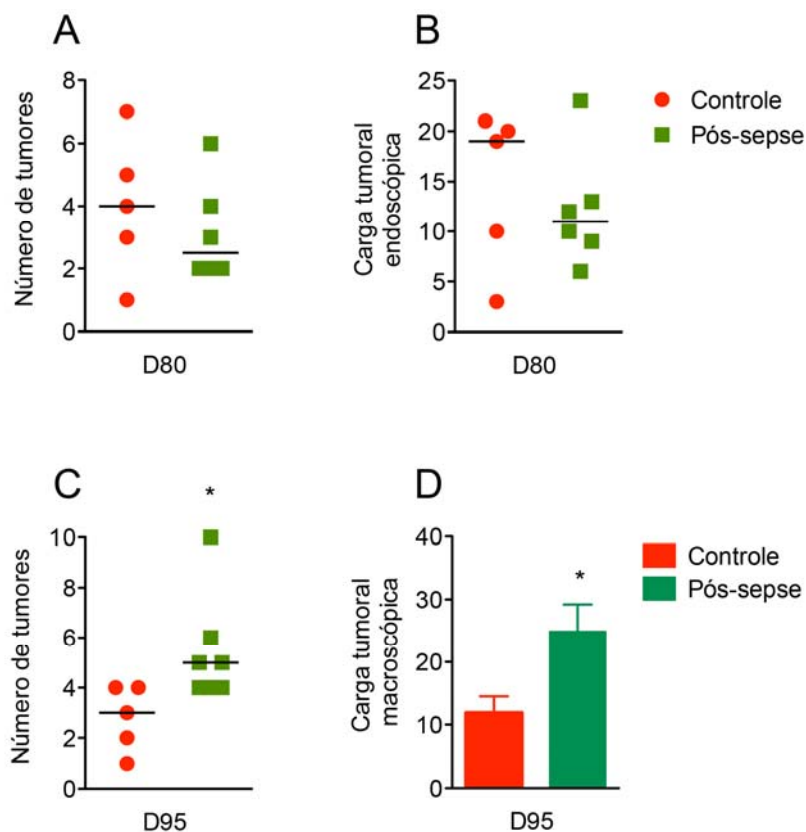


**Figura 46** - Número de tumores e da carga tumoral dos animais DEREG após tratamento com DTX por colonoscopia. Observou-se que número de tumores e carga tumoral semelhantes no dia 52 entre os grupos controle e pós-sepse que recebeu a toxina diftérica. Os valores da figura representam a mediana dos valores de números de tumores ou de carga tumoral. Grupos: controle que receberam AOM/DSS, pós-sepse que receberam AOM/DSS, controle que receberam AOM/DSS + toxina, pós-sepse que receberam AOM/DSS + toxina. Comparação empregou teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. \* $p < 0,05$  vs DTX pós-sepse. (n.d. não determinado devido morte antes da avaliação).

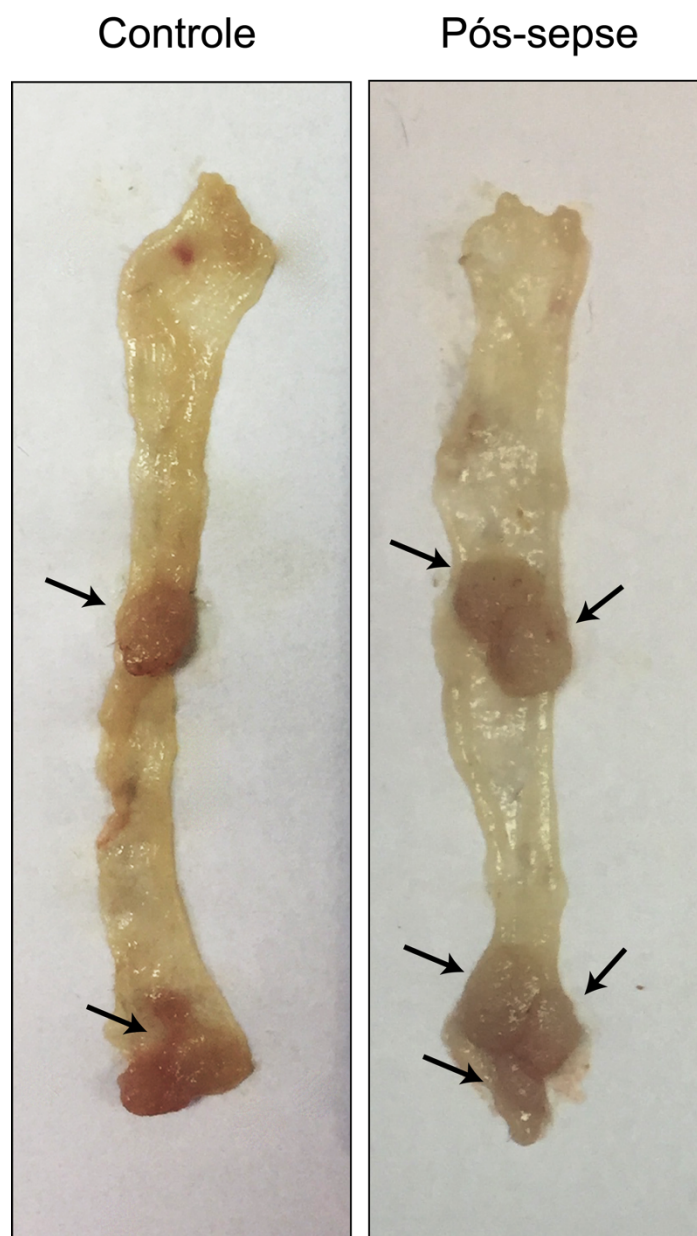
## 5.4 PROGRESSÃO TUMORAL

Foi realizado um experimento no qual os animais eram submetidos a iniciação tumoral com AOM+DSS. Após 65 dias, todos os animais apresentavam tumores, momento no qual foram randomizados em um grupo controle e um grupo que seria feito CLP. Os animais controle e pós-sepse tinham a mesma quantidade de tumores e carga tumoral 15 dias após a sepse, contudo 30 dias após a sepse, como não era possível mensurar por colonoscopia devido ao grande volume dos tumores, os animais foram eutanasiados e foi observado um maior número de tumores nos animais pós-sepse com maior carga tumoral (Figuras 47 e 48).



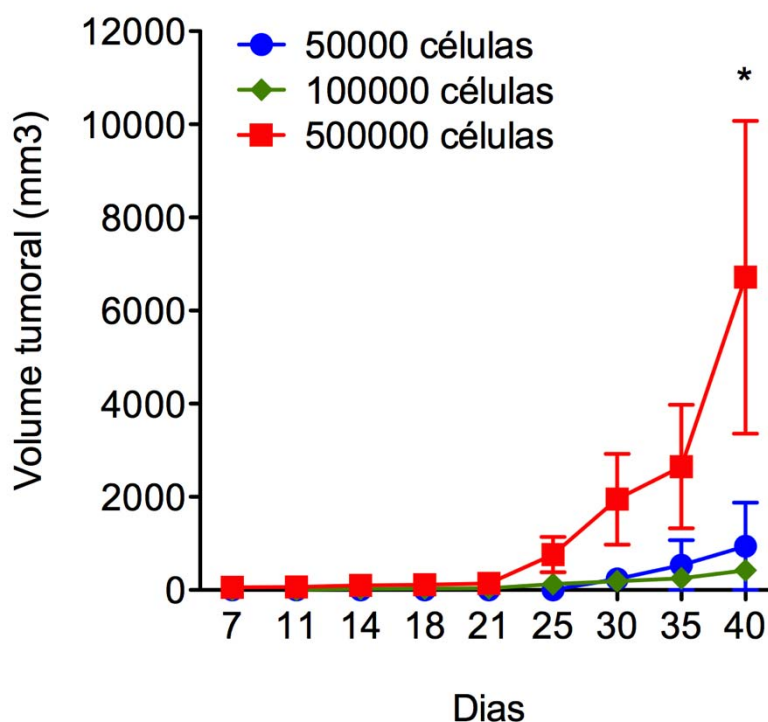


**Figura 47** - Número de tumores e da carga tumoral por colonoscopia e macroscopia de animais pós-AOM/DSS submetidos à CLP. Maior número de tumores e carga tumoral nos animais pós-sepse pós-iniciação. Os valores da figura representam a mediana dos valores de números de tumores ou de carga tumoral. Grupos: controle que AOM/DSS, pós-sepse pós-AOM/DSS. Comparação empregou teste t de student. \* $p < 0,05$ .



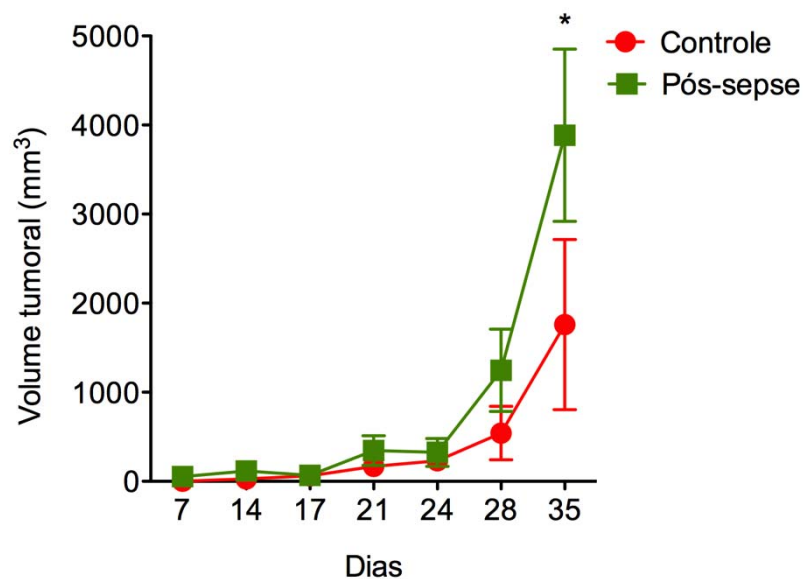
**Figura 48** - Fotografias representativas com visão macroscópica de cólons de animais pós-AOM/DSS submetidos à CLP. O cólon do animal controle apresenta menos tumores visíveis macroscopicamente quando comparado ao cólon do animal pós-CLP.

Além disso, para estabelecer um outro modelo de progressão tumoral, foi avaliado crescimento de tumores gerados pela inoculação de células de carcinoma de cólon no tecido subcutâneo. Inicialmente, foi realizada uma curva com três quantidades diferentes de células de linhagem de tumor colorretal (MC38). No decorrer dos dias, os tumores foram avaliados por paquimetria. A dose de  $1,0 \times 10^5$  células foi capaz de promover o crescimento tumoral com menor variação, assim para o estudo com animais controle e pós-sepse, foi adotada essa quantidade de células (Figura 49).

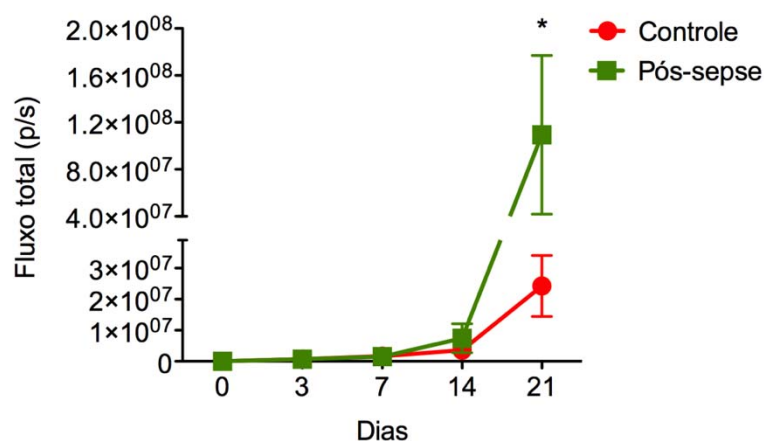


**Figura 49** - Variação do volume tumoral em  $\text{mm}^3$  medido por paquímetro em função do tempo em dias. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores dos volumes tumorais em  $\text{mm}^3$ . Grupos:  $5,0 \times 10^4$ ,  $1,0 \times 10^5$ ,  $5,0 \times 10^5$  células inoculadas por via s.c.. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$  vs  $5,0 \times 10^4$  células,  $1,0 \times 10^5$  células.

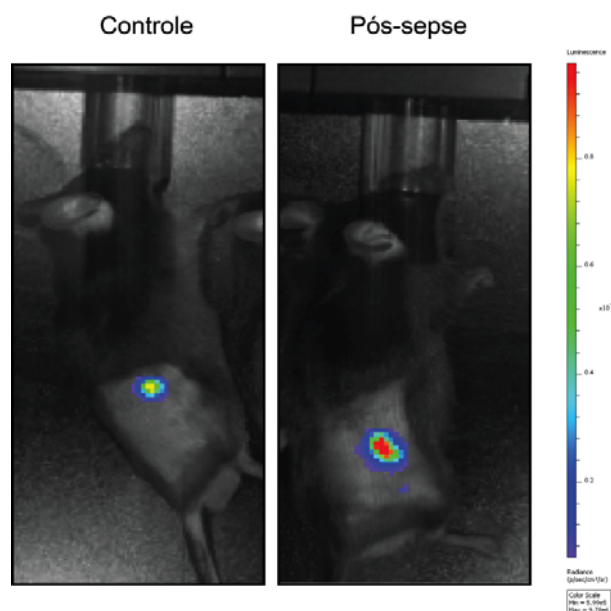
Posteriormente, foi evidenciado por paquimetria e por bioluminescência que os animais pós-sepse tinham um crescimento tumoral exacerbado em comparação com animais controle (Figuras 50, 51 e 52).



**Figura 50** - Variação do volume tumoral em mm<sup>3</sup> medido por paquímetro em função do tempo em dias de animais controle e pós-sepse. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores dos volumes tumorais em mm<sup>3</sup>. Grupos: controle e pós-sepse com 10<sup>5</sup> células s.c. A comparação entre os grupos foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham \* $p < 0,05$  vs controle.



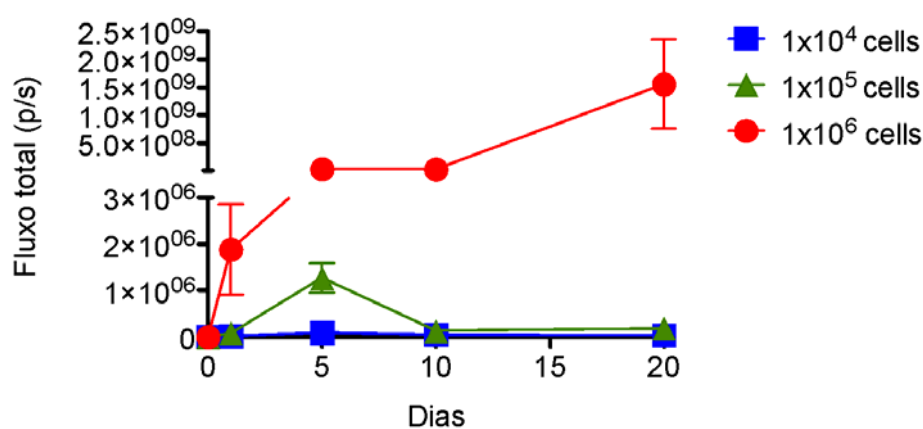
**Figura 51** - Crescimento de tumores após inoculação de células tumorais no subcutâneo de animais controle e pós-sepse avaliada bioluminescência. O crescimento dos tumores foi estimado a partir da variação do fluxo total (fótons por segundo) medida por bioluminescência em função do tempo em dias. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do fluxo total (fótons por segundo). Grupos: controle e pós-sepse com  $1,0 \times 10^5$  células s.c. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$  vs controle.



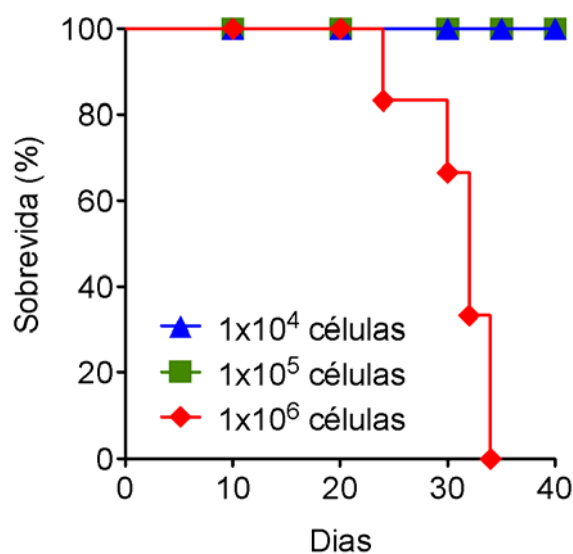
**Figura 52** - Fotografia representativa de camundongos durante a medição da bioluminescência no dia 21 de animais injetados com células MC38 no subcutâneo. Os animais pós-CLP emitem uma maior intensidade de fótons por segundo e consequentemente apresentam tumores maiores.

## 5.4 EXPERIMENTO DE COLONIZAÇÃO ESPLÊNICA (METÁSTASE)

Para estabelecer o modelo de colonização esplênica, inicialmente, foi realizada uma curva com três quantidades diferentes de células, que foram injetadas no baço dos animais. No decorrer dos dias, os tumores foram avaliados por bioluminescência. A dose de  $1,0 \times 10^6$  células foi a única capaz de promover o crescimento tumoral nos animais. Assim, para o estudo com animais controle e pós-sepse, foi adotada essa quantidade de células (Figuras 53 e 54).

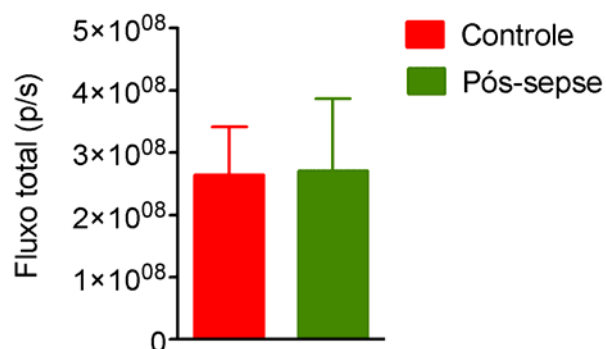


**Figura 53** - Variação do fluxo total (fótons por segundo) medido por bioluminescência em função do tempo em dias de acordo com injeção de quantidades diferentes de células no baço. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do fluxo total (fótons por segundo). Grupos:  $1,0 \times 10^4$ ,  $1,0 \times 10^5$ ,  $1,0 \times 10^6$  células intra-esplênica. A comparação empregou o teste ANOVA seguida do teste de Bonferroni. Os valores significativos tinham  $*p < 0,05$  vs  $10^4$ ,  $10^5$ .

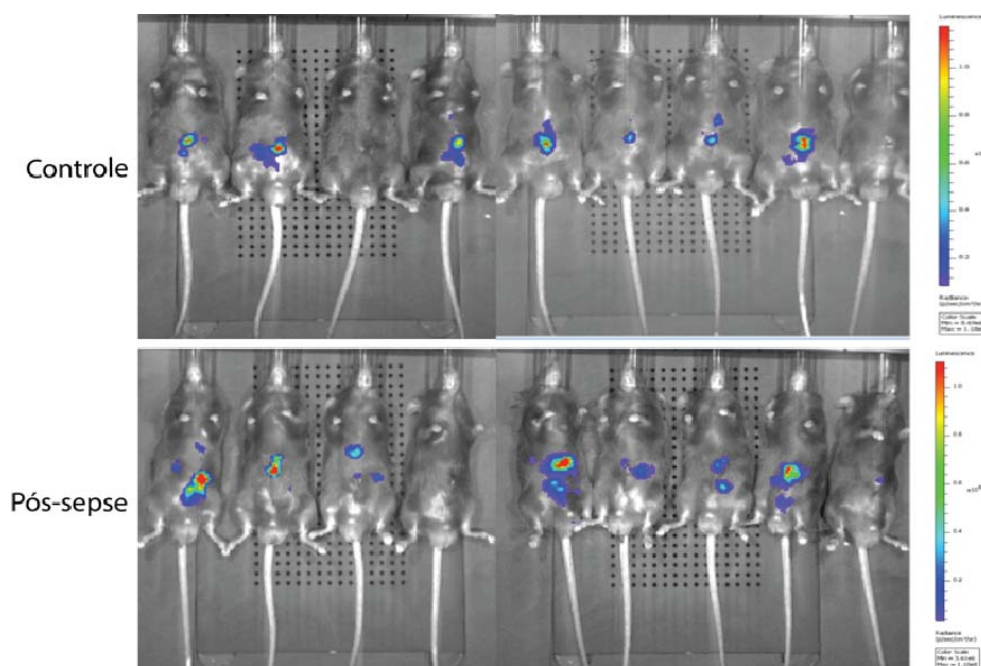


**Figura 54** - Sobrevida dos animais submetidos ao protocolo de colonização esplênica após inoculação com diferentes volumes de células tumorais. Os valores da figura representam os valores de porcentagem de animais vivos. Grupos:  $1,0 \times 10^4$ ,  $1,0 \times 10^5$ ,  $1,0 \times 10^6$  células intra-esplênicas. As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier.

Em seguida, foi evidenciado que no décimo dia após a injeção de MC38luc, os animais controle e pós-sepse não apresentaram diferença significativa no tocante ao fluxo total de fótons (Figura 55), contudo, ao se observar as fotografias (Figura 56), ficou evidente que os animais pós-sepse apresentam maior quantidade de metástases hepáticas, diferentemente dos animais controle que têm sua bioluminescência concentrada na região do baço.



**Figura 55** - Fluxo total (fótons por segundo) medido por bioluminescência no décimo dia em animais *controle* e pós CLP injetados com  $1,0 \times 10^6$  no baço. Os valores da figura representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores do fluxo total (fótons por segundo). Grupos: *controle* e CLP com  $1,0 \times 10^6$  células injetadas por via intra-esplênica. A comparação foi feita pelo teste t de Student.



**Figura 56** - Fotografias representativas de animais submetidos a medição de bioluminescência no décimo dia de animais injetados com células MC38 no baço. Os animais pós-sepse tem uma intensidade de fótons por segundo sendo liberados em várias localizações, enquanto os controle tem uma localização pontual indicando estar presente apenas no baço.



## 6 DISCUSSÃO

A conexão entre inflamação e câncer vem sendo estudada desde meados do século XIX, quando Virchow propôs que a presença de infiltrados inflamatórios crônicos em tumores estariam associados à origem do câncer (BALKWILL e MANTOVANI 2001).

Danos ao material genético causados pelo estresse oxidativo em ambientes cronicamente inflamados estão relacionados à carcinogênese colorretal. (LONGO et al. 2015). Em teoria, a redução dessa inflamação crônica acarreta redução da carcinogênese colorretal associada à colite. Contudo, até o momento, nenhuma terapia anti-inflamatória se mostrou capaz de prevenir o desenvolvimento desse tipo de câncer (LONGO et al. 2015).

Ao período após a resolução da sepse está associado à resposta anti-inflamatória sistêmica presente em pacientes sobreviventes à sepse (HOTCHKISS et al. 2013). MOTA et al. (2016) demonstraram experimentalmente que animais sobreviventes à sepse e posteriormente inoculados com linhagem celular de melanoma desenvolveram maior progressão tumoral quando comparados a animais controle. Contudo, ao nosso conhecimento, não existem estudos clínicos ou experimentais que associam o estado de imunossupressão pós-sepse com a iniciação de tumores.

O presente trabalho forneceu evidências experimentais de que

animais sobreviventes à sepse submetidos ao protocolo de carcinogênese colorretal associada à colite apresentaram redução da colite e do desenvolvimento de tumores quando comparados aos animais não previamente submetidos à sepse. Foi observado que o acúmulo de linfócitos T reguladores em camundongos sobreviventes à sepse apresentou uma associação causal com a menor ocorrência de colite, de adenomas e câncer colorretal. Finalmente, assim como demonstrado na literatura com outros cânceres, tumores colorretais pré-estabelecidos tiveram um maior crescimento em animais pós-sépticos.

A mortalidade proveniente da sepse está relacionada inicialmente a uma resposta pró-inflamatória sistêmica exacerbada, com danos em múltiplos órgãos (SINGER et al. 2016). Os atuais protocolos de tratamento determinaram maior sobrevida nos últimos anos (DELLINGER et al. 2013). Contudo, os pacientes que sobrevivem à sepse podem apresentar à longo prazo uma resposta anti-inflamatória compensatória, imunossupressora, que se associa a maior incidência de infecções secundárias oportunistas (PRESCOTT et al. 2016).

Experimentalmente, alguns modelos animais foram desenvolvidos com o intuito de mimetizar a patogênese da sepse. Dentre eles, o modelo de CLP pode ser considerado uma importante ferramenta (BURAS et al. 2005). Animais submetidos à CLP e tratados com antibióticos têm uma sobrevida em torno de 50%, e os animais sobreviventes apresentam imunossupressão e maior susceptibilidade a outras doenças. Nesse sentido, NASCIMENTO et al. (2010) e RESTAGNO et al. (2016) instilaram *Legionella pneumophila* e

*Pseudomonas aeruginosas*, respectivamente, nos pulmões de camundongos sobreviventes à sepse, evidenciando uma maior letalidade nesses animais quando comparado a animais controle sem sepse (NASCIMENTO et al. 2010; RESTAGNO et al. 2016).

Além de doenças infecciosas, animais pós-sépticos apresentam maior crescimento tumoral quando inoculados com linhagens tumorais de câncer de pulmão (CAVASSANI et al. 2010) ou melanoma (MOTA et al. 2016).

Contudo, até o momento, não há trabalhos que tenham explorado o papel do estado de imunossupressão pós-sepse no desenvolvimento de outras doenças inflamatórias e auto-imunes. Nesse sentido, este trabalho explorou de forma inédita o papel da imunossupressão pós-sepse no desenvolvimento de colite e CAC.

O CCR é terceira maior causa de morte relacionada ao câncer (TORRE et al. 2015). Embora os tumores esporádicos sejam mais prevalentes, o CCR pode estar associado à retocolite ulcerative e doença de Crohn prolongadas (EKBOM et al. 1990). Com intuito de mimetizar o CAC, diversos modelos experimentais foram produzidos (WARD e TREUTING 2014). Dentre eles, o modelo de carcinogênese química utilizando o AOM (carcinógeno) e DSS (indutor de colite) tem sido amplamente utilizado devido a sua semelhança molecular com a doença em humanos (BECKER et al. 2004; FAZIO et al. 2011).

Em nosso trabalho, foi utilizado o modelo AOM/DSS em camundongos C57BL/6, e, corroborando dados da literatura (NEUFERT et al. 2007; PASTILLE et al. 2014), foi evidenciada colite após cada ciclo de

DSS e presença de adenomas e adenocarcinomas colorretais ao final do protocolo de 65 dias. Por outro lado, animais sobreviventes à sepse não desenvolveram colite e apresentaram uma quantidade reduzida de tumores quando submetidos ao mesmo protocolo.

Diversos mecanismos pró-inflamatórios estão envolvidos no processo fisiopatológico da colite induzida pelo DSS, dentre eles a produção e liberação de citocinas e quimiocinas parece ser crucial (PERŠE e CERAR 2012).

Dentre as respostas pró-inflamatórias que podem atuar em danos teciduais, a resposta Th1 é caracterizada pela produção de IFN- $\gamma$ , o qual ativa células apresentadoras de antígenos e inibe a resposta Th2 (TEIXEIRA et al. 2005). Evidências da literatura sugerem que o IFN- $\gamma$  exerce papel na colite induzida por DSS. Camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de colite com 5 dias de DSS na água, apresentaram grande produção de RNAm de IFN- $\gamma$ , o qual estava diretamente relacionado ao grau de colite (EGGER et al. 2000). Em outro trabalho com colite experimental, utilizando camundongos C57BL/6, foi demonstrado uma maior produção de IFN- $\gamma$  nos dias 5 e 12 após o início do ciclo de 5 dias de DSS na água (MELGAR et al. 2005). Posteriormente, ITO et al. (2006) evidenciaram uma inibição total da colite induzida por DSS em animais geneticamente modificados com deleção do gene para IFN- $\gamma$  (ITO et al. 2006). De maneira semelhante, houve aumento dos níveis de IFN- $\gamma$  no intestino em nosso modelo de colite em camundongos naive, mas não em camundongos sobreviventes à sepse.

Outra importante citocina envolvida na resposta inflamatória aguda é

a IL-1 $\beta$ , a qual pode ser produzida por macrófagos, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas (DINARELLO 2011). ARAI et al. (1998) foram os primeiros a mostrar a importância da IL-1 $\beta$  na gênese da colite induzida por DSS. Os autores evidenciaram um aumento de RNAm de IL-1 $\beta$  já no quinto dia após o início da indução da colite. Com isso, utilizaram anticorpos contra o ligante ou contra o receptor IL-1R e observaram colite mais branda nos animais assim tratados (ARAI et al. 1998). Sugere-se que o mecanismo de indução de produção de IL-1 $\beta$  na colite induzida por DSS é dependente da ativação do inflamassoma NLRP3 e da caspase-1, uma vez que sua inibição, utilizando, respectivamente, camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> e o inibidor de caspase-1, pralnacasan, reduziu a colite e os níveis de IL-1 $\beta$  (BAUER et al. 2010).

Em fases mais tardias da carcinogênese do CAC, também ocorre aumento de IL-1 $\beta$ . Este achado está relacionado a maior crescimento tumoral e mortalidade em modelos de tumores xenográficos (ELARAJ et al. 2006). O uso do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) durante os ciclos de DSS do protocolo AOM/DSS, reduziu o número de tumores (WANG et al. 2014a). Em concordância, nosso trabalho evidenciou dois momentos em que ocorre maior concentração de IL-1 $\beta$  no cólon dos animais controle submetidos ao modelo de colite experimental, nos dias 12 e 65. Enquanto isso, os animais pós-sepse não apresentaram aumentos significativos de IL-1 $\beta$ .

No presente trabalho também foi possível observar um acúmulo de TNF no cólon de animais controles nos dias 12 e 65 do AOM/DSS, o qual

não ocorreu em animais pós-sepse. Dados da literatura sugerem que o TNF não apresenta um papel crucial na patogênese da fase aguda da colite induzida por DSS, em animais geneticamente deficientes para TNF observa-se piora da colite, com maior perda de peso e parâmetros inflamatórios comparado a animais selvagens (NOTI et al. 2010). Dessa forma, o aumento de TNF na fase aguda da colite pode ser unicamente resultado da inflamação. Por outro lado, a ausência de sinalização do TNF, como observado em animais deficientes para o receptor TNFR1 ou através do sequestro de TNF pelo uso do receptor solúvel (ertanecept), reduz o desenvolvimento de tumores colorretais em animais submetidos ao AOM/DSS. Além disso, foi demonstrado que o mecanismo de indução da carcinogênese mediado pelo TNF é dependente de COX-2 e beta-catenina (POPIVANOVA et al. 2008).

Outra importante citocina de fase aguda, a IL-6, demonstra ser um importante estímulo para a proliferação das células epiteliais normais ou malignas do intestino. Assim, animais deficientes para IL-6 apresentam colite mais acentuada que animais selvagens na fase aguda da colite, contudo, desenvolvem uma menor quantidade de tumores colorretais (GRIVENNIKOV et al. 2009). No presente trabalho, foi demonstrado picos de IL-6 no cólon de animais controle nos dias 12 e 65, o que não foi observado nos animais pós-sepse. Nesse caso, nossa hipótese seria de que a IL-6 estaria atuando na regeneração celular intestinal dos animais controle mas poderia acarretar em maior proliferação tumoral. No caso dos animais previamente submetidos à CLP, a pequena quantidade de IL-6 não parece ser suficiente

para prejudicar a regeneração intestinal, uma vez que outros desencadeadores da colite também não estão presentes nesses animais.

GRIVENNIKOV et al. (2009) observaram que animais deficientes para IL-6 apresentaram menor produção de IL-17A no modelo de colite. Assim como nos animais IL-6<sup>-/-</sup>, foi observada uma menor quantidade de tumores colorretais em animais IL-17A<sup>-/-</sup> quando comparados a animais selvagens submetidos ao protocolo AOM/DSS (HYUN et al. 2012). Na inflamação aguda, animais IL-17A<sup>-/-</sup> apresentaram menor escore de colite que animais selvagens, com menor produção de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-6 (HYUN et al. 2012). Nesse sentido, nossos dados apontam que a IL-17 encontra-se aumentada tanto na fase aguda da colite como também durante a progressão tumoral. Animais do grupo pós-sepse tratados com DSS, por outro lado, não apresentaram aumento de IL-17.

A quimiocina KC/CXCL1 é um potente quimioatraente de neutrófilos ao ligar-se em seu receptor CXCR2 (KOLACZKOWSKA e KUBES 2013). Diversos trabalhos vêm destacando a importância dos neutrófilos na patogênese da inflamação intestinal (FOURNIER e PARKOS 2012). A partir da inibição do recrutamento de neutrófilos com o uso de antagonistas (BENTO et al. 2008), anticorpos (FAROOQ et al. 2009) ou deleção gênica do CXCR2 (BUANNE et al. 2007), foi possível demonstrar que a redução do infiltrado neutrofílico na mucosa intestinal reduz a colite induzida por DSS. Além disso, animais CXCR2<sup>-/-</sup> submetidos ao modelo de carcinogênese com AOM/DSS apresentaram uma supressão da formação de tumores colorretais (JAMIESON et al. 2012). Corroborando estes dados, nosso trabalho

demonstrou que animais pós-sepse não apresentaram níveis elevados de KC no cólon, diferentemente dos animais controle que tiveram aumento nos dias 12 e 65, podendo ser um dos motivos da redução da inflamação e carcinogênese.

Outras quimiocinas parecem ser importantes no processo de inflamação intestinal aguda e crônica induzida por DSS (ALEX et al. 2009). A quimiocina MIG/CXCL9 liga-se no receptor CXCR3 e tem a função de atrair linfócitos (FARBER 1997). É importante destacar que a produção de MIG é induzida por IFN- $\gamma$ . Assim, em animais IFN- $\gamma^{-/-}$  submetidos ao protocolo de CAC, nos quais houve uma menor inflamação intestinal e carcinogênese, houve também uma reduzida produção de MIG (ITO et al. 2006). Em nosso trabalho, ficaram evidentes dois picos de produção de MIG nos dias 12 e 65.

A interleucina-33, um membro da família da IL-1, é um importante modulador do sistema imune, muitas vezes atuando como uma alarmina (CAYROL e GIRARD 2014). A IL-33 apresenta níveis aumentados nas células epiteliais intestinais (CAYROL e GIRARD 2014). O bloqueio da atividade de IL-33 através do uso de animais modificados com deleção do seu receptor (ST2), reduz a colite induzida por DSS através do aumento da regeneração da mucosa (SEDHOM et al. 2013). Por outro lado, quando foi injetada IL-33 exógena, a colite aguda foi agravada (ZHU et al. 2015). Embora a IL-33 tenha contribuído para a colite aguda, cronicamente, ela contribui para redução da colite induzida por DSS através direcionamento para um perfil de citocinas Th2 (GROS et al. 2012). Em nosso trabalho, foi encontrado um aumento nos níveis de IL-33 nos cólons dos animais controle



com AOM/DSS nos dias 12, o qual está relacionado ao aumento da colite aguda. Por outro lado, foi encontrado níveis aumentados de IL-33 nesses mesmos animais no dia 65, podendo estar relacionado a uma fase de regeneração tecidual.

Encontrou-se também que os níveis de IL-33 estão elevados nos animais pós-sepse em relação aos animais controle 15 dias após a CLP. Este fato, está relacionado a um aumento de células Treg nesse período da imunossupressão pós-sepse, uma vez que a IL-33 estabiliza as Treg (SCHIERING et al. 2014).

A sinalização do TGF- $\beta$  é uma via essencial no estabelecimento da tolerância imunológica (LI et al. 2013). Desta forma, camundongos geneticamente deficientes no receptor de TGF- $\beta$  desenvolvem uma síndrome inflamatória fatal e deficiência na geração ou manutenção de células Treg naturais (LI et al. 2013). Camundongos deficientes para o receptor de TGF- $\beta$  tipo II tiveram menor susceptibilidade à carcinogênese colorretal associada à colite induzida por AOM/DSS, com redução no número e tamanho de tumores (LI et al. 2013). Esses mesmos camundongos produziram menores quantidades de IL-6 e TNF (LI et al. 2013). Além disso, os autores observaram um aumento na proporção de células Treg na lâmina própria em estágios iniciais do CAC (LI et al. 2013). Em nosso trabalho, encontrou-se níveis aumentados de TGF- $\beta$  nos cólons dos animais controle que receberam AOM/DSS comparado aos outros animais apenas no dia 65, refletindo o aumento de IL-6, TNF e Treg.

Em nosso trabalho, foi encontrado um aumento da citocina IL-23 nos

cólons dos animais pós-sepse AOM/DSS em comparação aos animais controle AOM/DSS no dia 65. Nesse mesmo momento, níveis elevados de IL-33 estão presentes nos animais controle AOM/DSS. SCHIERING et al. (2014) demonstraram que a IL-23 reduz a resposta das células Treg ao estímulo com IL-33 e que o equilíbrio entre essas duas citocinas é um importante controlador da resposta imune intestinal.

Além de citocinas e quimiocinas, fatores de crescimento, como o GM-CSF, são importantes para o desenvolvimento de células hematopoiéticas (XU et al. 2008). Agudamente, foram feitos estudos de colite induzida por DSS em animais selvagens e deficientes para GM-CSF, sendo observada colite mais intensa em animais deficientes, com maior produção de citocinas pró-inflamatórias (XU et al. 2008). Em fases mais tardias da carcinogênese do CAC, o GM-CSF promove o crescimento tumoral via VEGF (WANG et al. 2014b). Assim, evidenciou-se um aumento nos níveis intestinais de GM-CSF no dia 65, ou seja, durante a fase de progressão tumoral, o qual não foi detectado em animais sobreviventes à sepse.

De modo geral, nosso trabalho demonstrou um conjunto de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias sendo liberado durante a inflamação intestinal aguda induzida por DSS. Neste contexto, o DSS pode agir promovendo desregulação da microbiota intestinal (ZHANG et al. 2016) ou estimulando diretamente células apresentadoras de antígenos (BAUER et al. 2010). BAUER et al. (2010) demonstraram, em experimentos *in vitro*, que ao adicionar DSS em meio de cultura de macrófagos há um estímulo à produção de IL-1 $\beta$  de forma dependente do inflamassoma NLRP3. Outro

trabalho, dessa vez *in vivo*, demonstrou que existe um desequilíbrio entre a diferenciação de macrófagos M1 e M2 durante a colite induzida por DSS, sendo a presença das células M1 mais pronunciadas no processo inflamatório agudo (ZHU et al. 2014; WANG et al. 2015). Por outro lado, ZHU et al. (2014) demonstraram que ao injetar células M2 por via endovenosa foi possível reduzir a colite e a produção de citocinas inflamatórias, e relacionou esses resultados com o aumento de células Treg.

Em nosso trabalho, evidenciou-se um aumento de macrófagos M2 no cólon dos animais pós-sepse, o que pode estar relacionado com a inibição da colite e com a redução da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias nesses animais. Além disso, demonstrou-se que o DSS, quando adicionado a meio de cultura de macrófagos derivados da medula, induz polarização no sentido M1, o que justificaria a inflamação intestinal presente nos animais controle.

Outro elemento crítico para a indução de resposta pró-inflamatória é a célula dendrítica. Essas células são especializadas em apresentar antígenos promovendo a diferenciação das células T (BEKIARIS et al. 2014). Elas desempenham um importante papel na gênese da inflamação intestinal induzida por DSS, uma vez que ao promover a depleção dessas células, os animais expostos ao DSS pela água ingerida cursam com colite menos intensa. Por outro lado, quando os animais que recebem DSS são tratados com injeção endovenosa de células dendríticas, observa-se uma inflamação intestinal exacerbada (BERNDT et al. 2007).

No estudo atual, demonstrou-se que o DSS induz maior diferenciação

para Th1 e Th17 em co-culturas de células dendríticas derivadas da medula com linfócitos T *naive*. A sepse a longo prazo cursa com uma redução na quantidade ou funcionalidade de células dendríticas em camundongos (BENJAMIM et al. 2005) e humanos (GRIMALDI et al. 2011). Assim, sugere-se que os camundongos pós-sepse possam estar produzindo menor quantidade de citocinas de perfil Th1 e Th17 devido à inibição das células dendríticas.

A disfunção das células dendríticas acontece através de mecanismos epigenéticos e pode resultar em menor resposta Th1 e maior frequência de infecções secundárias (WEN et al. 2008). Além disso, foi demonstrado experimentalmente que animais pós-sepse com fenótipo clínico normal apresentam maior quantidade de Treg sistemicamente (NASCIMENTO et al. 2010). Quando foi feita a inibição de células Treg nesse período houve uma redução da susceptibilidade dos animais a infecções pulmonares (NASCIMENTO et al. 2010) e ao crescimento de tumores (CAVASSANI et al. 2010).

Em pacientes com câncer, o valor prognóstico da frequência de células Treg em tumores pode ser controverso. Contudo, em tumores colorretais, foi evidenciado, em duas metanálises recentes, que pacientes com tumores de cólon, infiltrados com altos níveis de células Treg apresentam maior sobrevida global do que pacientes com baixos níveis (HUANG et al. 2014; SHANG et al. 2015). SAITO et al. (2016) distinguiram as células Treg em dois perfis: supressoras com FOXP3<sup>high</sup> e não-supressoras com FOXP3<sup>low</sup>. Ambas produzidas a partir do clássico estímulo

com TGF- $\beta$ , contudo as FOXP3<sup>low</sup> dependem também de IL-12. Pacientes com maior quantidade de FOXP3<sup>low</sup> em tumores colorretais apresentaram sobrevida global maior que aqueles com alta infiltração por FOXP3<sup>high</sup>. Os autores também encontraram que pacientes com maior expressão de IL-12 nos tumores tinham maior sobrevida (SAITO et al. 2016).

Experimentalmente, a quantidade de células Treg detectada no cólon por citometria de fluxo encontra-se aumentada ao final do protocolo AOM/DSS (PASTILLE et al. 2014). Foi demonstrado também que a ablação dessas células durante os ciclos de DSS, ocasionou exacerbação da resposta inflamatória com morte dos animais. No entanto, quando essas células foram depletadas em estágios tardios, quando os tumores colorretais já estavam estabelecidos, houve uma redução no crescimento tumoral (PASTILLE et al. 2014). Por outro lado, ao fazer transplante autólogo de células Treg em animais que foram submetidos aos modelo de colite por infecção com *Leishmania major* (LIU et al. 2003) e colite em animais imunodeficientes que receberam células T CD4 (MOTTET et al. 2003), ocorreu a resolução dos parâmetros inflamatórios.

Assim, é possível inferir que um aumento na quantidade de células Treg durante a colite induzida por DSS poderia cursar com menor inflamação. Por outro lado, um aumento quando já houve a transformação maligna seria capaz de acelerar a progressão tumoral. Nesse contexto, nosso trabalho demonstrou que as Treg encontram-se aumentadas no cólon dos camundongos pós-sepse durante o primeiro ciclo de DSS em comparação a animais *naive*, podendo ser este o motivo pelo qual esses

camundongos não desenvolvem colite. No decorrer do experimento, foi observado que o primeiro ciclo de DSS foi capaz de promover aumento de Treg no cólon de animais controle, algo que não aconteceu nos animais pós-sepse. Além disso, ao final do protocolo houve um aumento exacerbado na quantidade de células Treg no cólon de animais controle, enquanto a quantidade de Treg no cólon de animais pós-sepse se manteve constante.

Para avaliar se as células Treg de fato seriam as responsáveis pela inibição da colite e do CAC nos animais pós-sepse, foram utilizados dois protocolos de depleção dessas células, utilizando ciclofosfamida ou animais DREG.

A ciclofosfamida é um alquilante empregado no tratamento de diversos tumores e doenças autoimunes (COLVIN 1999). Em baixas doses, a ciclofosfamida pode depletar células Treg, promovendo um aumento da resposta imune (LUTSIK et al. 2005; ZHAO et al. 2010). Em nosso protocolo, os animais foram tratados com ciclofosfamida um dia antes da injeção de AOM e avaliados no tocante aos parâmetros inflamatórios colonoscópicos. Dessa maneira, foi observada colite mais intensa em animais pós-sepse que receberam ciclofosfamida quando comparado aos animais pós-sepse sem tratamento, embora não seja possível descartar um possível efeito citotóxico sobre a mucosa intestinal. Ainda, no dia 52, foi constatado a presença de tumores nesses animais, apesar de em menor quantidade quando comparado aos animais controle submetidos ao AOM/DSS.

Os animais DREG expressam o receptor da toxina diftérica em

fusão com a proteína GFP sob controle do promotor do gene *foxp3*, permitindo a depleção de células Treg ao injetar os camundongos com DTX (LAHL et al. 2007). Dessa forma, dois grupos de animais controle e pós-sepse foram injetados com DTX dois dias consecutivos antes de se iniciar o protocolo com AOM/DSS. Os animais controle não sobreviveram ao fim do primeiro ciclo. Isso demonstra a importância de Tregs na homeostase intestinal dos animais e corrobora achados prévios da literatura (PASTILLE et al. 2014). Assim, os animais pós-sepse que receberam DTX passaram a ter escores de colite semelhante a dos animais controle, após os três ciclos de DSS. Esses animais também desenvolveram tumores similares aos animais controle. Por outro lado, o aumento de Treg na mucosa intestinal induzido pela administração de baixas doses da toxina da cólera antes dos ciclos de DSS reduz a colite e inibe o desenvolvimento de tumores decorrentes do AOM/DSS (DOULBERIS et al. 2014).

Dessa maneira, torna-se claro que as células Treg presentes nos animais pós-sepse podem suprimir a inflamação intestinal e limitar a iniciação da carcinogênese de tumores dependentes de inflamação. Por outro lado, a supressão da imunovigilância pelas células Treg pode facilitar o crescimento de tumores em modelos de inoculação de células tumorais no subcutâneo (CAVASSANI et al. 2010).

A partir dessa informação, foi introduzida a hipótese de que animais submetidos ao protocolo AOM/DSS e, posteriormente, à sepse, teriam maior progressão tumoral. De fato, esses animais apresentaram maior número de tumores e carga tumoral do que animais controle. Além disso, em

consonância com dados da literatura (CAVASSANI et al. 2010; MOTA et al. 2016), foi realizada injeção heterotópica de células de linhagem de câncer colorretal (MC38) no subcutâneo e observado um maior crescimento tumoral nos animais pós-sepse. Ainda, essas células foram também injetadas no baço de animais controle e pós-sepse, sendo evidente o desenvolvimento de maior carga tumoral no fígado de animais sobreviventes à sepse.

Em suma, nossos dados sustentam a ideia de que animais sobreviventes à sepse tem redução da inflamação intestinal e conseqüentemente do CAC, de maneira dependente de células Treg. Entretanto, camundongos sobreviventes à sepse apresentaram maior crescimento de CRC inoculado no subcutâneo, assim como maior carga tumoral hepática após inoculação esplênica. Dessa forma, o presente trabalho traz luz ao possível papel dual de linfócitos T reguladores na carcinogênese colorretal (Figura 57).

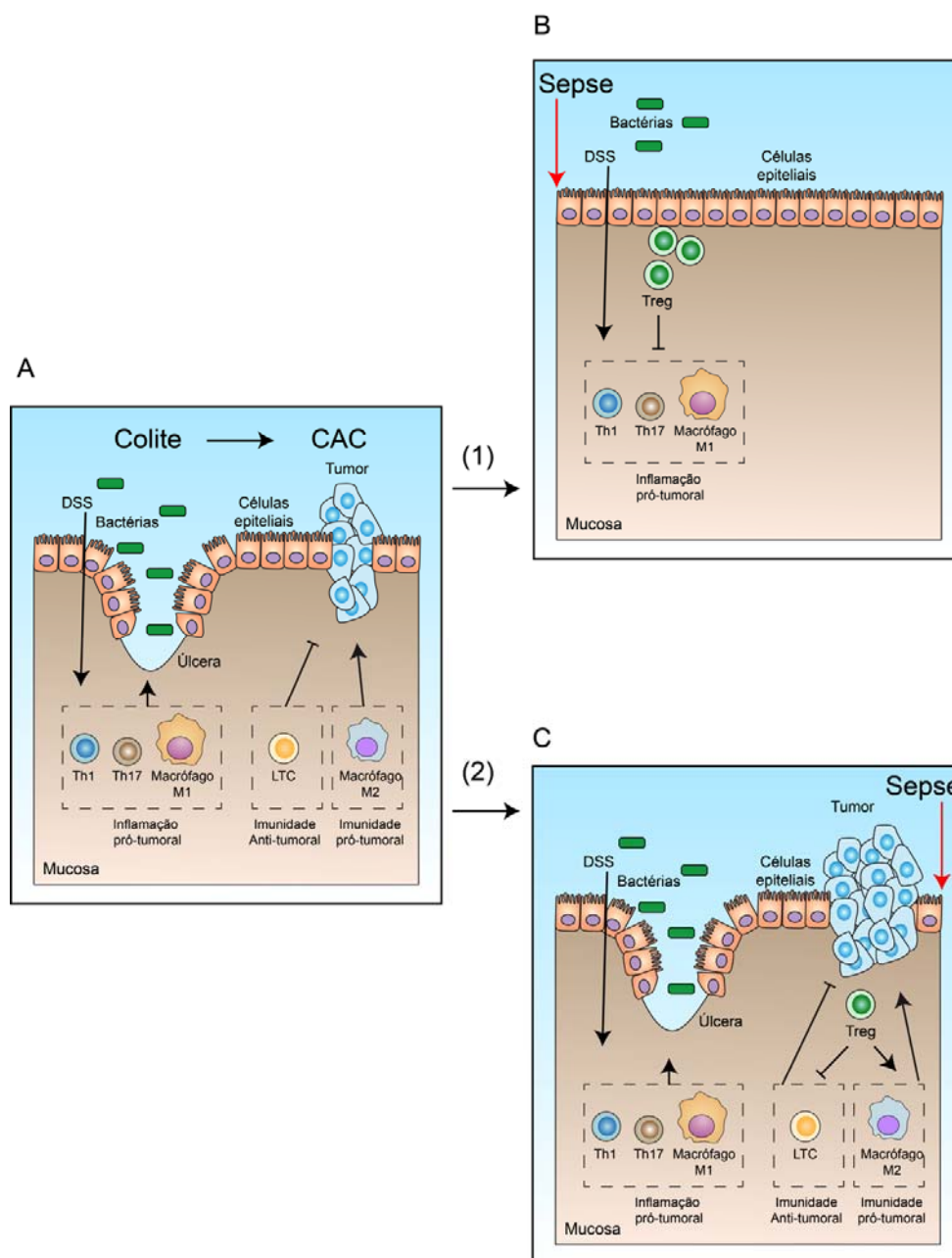
Em fases iniciais, em que a presença de inflamação é importante para o surgimento de adenomas, o estado pós-sepse e as Treg exerceriam papel protetor, ao inibir a carcinogênese induzida pela inflamação crônica. Já em fases mais tardias da carcinogênese colorretal, especulou-se que Tregs estão associados à promoção de maior crescimento tumoral, possivelmente através da promoção de evasão imune pela inibição de linfócitos T efetores.

A despeito de ter fornecido evidências para o entendimento do papel da sepse na inibição da carcinogênese do CAC, o conjunto de dados levantados neste trabalho também apresenta limitações dignas de nota. Por exemplo, não foi verificada a progressão tumoral após os 65 dias de



AOM/DSS. Portanto, não pode-se afirmar qual seria o comportamento tumoral nesse período. Além disso, limitou-se a mostrar a presença de células e citocinas em todo o cólon, tendo em vista as dificuldades técnicas de se obter quantidades suficientes de células dissecando apenas os tumores. Houve ainda dificuldade técnica em obter culturas de células (macrófagos e linfócitos) primárias do cólon, sendo por isso adotadas culturas derivadas da medula.

Atualmente, o uso clínico de estratégias que aumentam a quantidade de células Treg no organismo vêm sendo investigadas em diversas doenças autoimunes, como artrite reumatoide e diabetes tipo 1 (WEHRENS et al. 2010; VON BOEHMER e DANIEL 2013; SERR et al. 2016). Essas estratégias podem representar uma nova abordagem para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais e, conseqüentemente, para a prevenção do câncer colorretal associado à colite.



**Figura 57** - Papel da sepse e das células T reguladoras no desenvolvimento do câncer colorretal associado à colite. (A) Parede intestinal durante o processo da carcinogênese do câncer colorretal associado a colite induzida por AOM/DSS. (B) Parede intestinal durante o protocolo AOM/DSS precedido de sepse. (C) Parede intestinal durante o protocolo AOM/DSS sucedido por sepse. Na situação 1 as células Treg inibem a inflamação pró-tumoral e assim inibem a carcinogênese. Na situação 2 as células Treg inibem a atividade anti-tumoral e facilitam a imunidade pró-tumoral, favorecendo o crescimento tumoral. As setas representam ativação e as linhas inibição. LTC, linfócitos T citotóxicos.

## 7 CONCLUSÕES

- Foi demonstrado de forma inédita que há inibição da colite e iniciação tumoral do câncer colorretal associado à colite em camundongos sobreviventes à sepse.
- Ocorre inibição do aumento de múltiplas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias durante a iniciação tumoral de camundongos sobreviventes de sepse.
- Há maior diferenciação de macrófagos M1 e de perfis de linfócitos Th1 e Th17 a partir do estímulo com DSS.
- As células Treg e macrófagos M2 encontram-se aumentadas nos cólons de animais sobreviventes à sepse.
- Ocorre aumento de Treg nos cólons de animais controle no decorrer da iniciação tumoral.
- A depleção de linfócitos Treg foi capaz de reverter a inibição da colite e da iniciação tumoral no estado pós-sepse.
- Há favorecimento do crescimento tumoral do câncer colorretal pré-estabelecido em camundongos pós-sepse.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACCP] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med** 1992; 20:864-74.

Alex P, Zachos NC, Nguyen T, et al. Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. **Inflamm Bowel Dis** 2009; 15:341-52.

Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annu Rev Immunol** 2012; 30:459-89.

Ananthakrishnan AN, McGinley EL. Infection-related hospitalizations are associated with increased mortality in patients with inflammatory bowel diseases. **J Crohns Colitis** 2013; 7:107-12.

Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 2015; 12:205-17.

Angus DC, Opal S. Immunosuppression and secondary infection in sepsis: part, not all, of the Story. **JAMA** 2016; 315:1457-9.

Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med** 2013; 369:840-51.

Arai Y, Takanashi H, Kitagawa H, Okayasu I. Involvement of interleukin-1 in the development of ulcerative colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. **Cytokine** 1998; 10:890-6.

Attiê R, Chinen LT, Yoshioka EM, Silva MC, de Lima VC. Acute bacterial infection negatively impacts cancer specific survival of colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol** 2014; 20:13930-5.

Bain CC, Mowat AM. The monocyte-macrophage axis in the intestine. **Cell Immunol** 2014; 291:41-8.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet** 2001; 357:539-45.

Bamias G, Corridoni D, Pizarro TT, Cominelli F. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. **Cytokine** 2012; 59:451-9.

Bauer C, Duewell P, Mayer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate sodium (DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome. **Gut** 2010; 59:1192-9.

Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. **Lancet** 2012; 380:1590-605.

Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. **N Engl J Med** 2015; 372:1441-52.

Becker C, Fantini MC, Neurath MF. High resolution colonoscopy in live mice. **Nat Protoc** 2006; 1:2900-4.

Becker C, Fantini MC, Schramm C, et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. **Immunity** 2004; 21:491-501.

Bekiaris V, Persson EK, Agace WW. Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. **Immunol Rev** 2014; 260:86-101.

Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. **Cell** 2014; 157:121-41.

Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. **Blood** 2005; 105:3588-95.

Bento AF, Leite DF, Claudino RF, et al. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J Leukoc Biol** 2008; 84:1213-21.

Berman BP, Weisenberger DJ, Aman JF, et al. Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. **Nat Genet** 2011; 44:40-6.

Berndt BE, Zhang M, Chen GH, Huffnagle GB, Kao JY. The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. **J Immunol** 2007; 179:6255-62.

Bhatia S, Sklar C. Second cancers in survivors of childhood cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:124-32.

Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2073-2087.e3.

Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. **JAMA** 2011; 306:2594-605.

Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol** 2007; 28:340-5.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. **Nature** 1987; 327:293-7.

Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch PS, et al. Mutations in the p53 gene: an early marker of neoplastic progression in ulcerative colitis. **Gastroenterology** 1994; 107:369-78.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science** 2004; 303:1532-5.

Buane P, Di Carlo E, Caputi L, et al. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. **J Leukoc Biol** 2007; 82:1239-46.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov** 2005; 4:854-65.

Burmer GC, Rabinovitch PS, Haggitt RC, et al. Neoplastic progression in ulcerative colitis: histology, DNA content, and loss of a p53 allele. **Gastroenterology** 1992; 103:1602-10.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature** 2012; 487:330-7.

Cavassani KA, Carson WF 4th, Moreira AP, et al. The post sepsis-induced expansion and enhanced function of regulatory T cells create an environment to potentiate tumor growth. **Blood** 2010; 115:4403-11.

Cayrol C, Girard JP. IL-33: An alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. **Curr Opin Immunol** 2014; 31:31-7.

Chamouard P, Monneaux F, Richert Z, et al. Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naïve Crohn's disease. **Dig Dis Sci** 2009; 54:2084-93.

Chu H, Khosravi A, Kusumawardhani IP, et al. Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Science** 2016; 352:1116-20.

Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, et al. Sepsis: a roadmap for future research. **Lancet Infect Dis** 2015; 15:581-614.

Colvin OM. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications. **Curr Pharm Des** 1999; 5:555-60.

Dadabayev AR, Sandel MH, Menon AG, et al. Dendritic cells in colorectal cancer correlate with other tumor-infiltrating immune cells. **Cancer Immunol Immunother** 2004; 53:978-86.

Davis JS, He V, Anstey NM, Condon JR. Long term outcomes following hospital admission for sepsis using relative survival analysis: a prospective cohort study of 1,092 patients with 5 year follow up. **PLoS One** 2014; 9:e112224.

De Robertis M, Massi E, Poeta ML, et al. The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: from pathways to diagnosis and therapy studies. **J Carcinog** 2011; 10:9.

Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Crit Care Med** 2013; 41:580-637.



Dinarelo CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood** 2011; 117:3720-32.

Doulberis M, Angelopoulou K, Kaldrymidou E, et al. Cholera-toxin suppresses carcinogenesis in a mouse model of inflammation-driven sporadic colon cancer. **Carcinogenesis** 2014; 36:280-90.

Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, et al. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. **Cell** 2015; 161:1539-52.

Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. **J Clin Immunol** 2010; 30:80-9.

Eddy DM. Screening for colorectal cancer. **Ann Intern Med** 1990; 113:373-84.

Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, et al. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. **Digestion** 2000; 62:240-8.

Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer A population-based study. **N Engl J Med** 1990; 323:1228-33.

Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. **Clin Cancer Res** 2006; 12:1088-96.

Engström A, Erlandsson A, Delbro D, Wijkander J. Conditioned media from macrophages of M1, but not M2 phenotype, inhibit the proliferation of the colon cancer cell lines HT-29 and CACO-2. **Int J Oncol** 2014; 44:385-92.

Fantini MC, Becker C, Tubbe I, et al. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. **Gut** 2006; 55:671-80.

Fantini MC, Rizzo A, Fina D, et al. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. **Gastroenterology** 2009; 136:1308-16, e1-3.

Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. **J Leukoc Biol** 1997; 61:246-57.

Farooq SM, Stillie R, Svensson M, et al. Therapeutic effect of blocking CXCR2 on neutrophil recruitment and dextran sodium sulfate-induced colitis. **J Pharmacol Exp Ther** 2009; 329:123-9.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Current estimates and limitations. **Am J Respir Crit Care Med** 2016; 193:259-72.

Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:55-67.

Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:1472-9.

Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. **Mucosal Immunol** 2012; 5:354-66.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell** 2009; 16:183-94.

Gala M, Chung DC. Hereditary colon cancer syndromes. **Semin Oncol** 2011; 38:490-9.

Garrett WS, Punit S, Gallini CA, et al. Colitis-associated colorectal cancer driven by T-bet deficiency in dendritic cells. **Cancer Cell** 2009; 16:208-19.

Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmun Rev** 2014; 13:3-10.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell** 2004; 118:285-96.

Grimaldi D, Louis S, Pène F, et al. Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. **Intensive Care Med** 2011; 37:1438-46.

Grivnickov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. **Cancer Cell** 2009; 15:103-13.

Grivnickov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell** 2010; 140:883-99.

Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cell** 1991; 66:589-600.

Groß P, Doser K, Falk W, Obermeier F, Hofmann C. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. **Inflamm Bowel Dis** 2012; 18:1900-9.

Gross M, Salame TM, Jung S. Guardians of the Gut - Murine Intestinal Macrophages and Dendritic Cells. **Front Immunol** 2015; 6:254.

Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. **J Clin Oncol** 2010; 28:264-71.

Gupta RB, Harpaz N, Itzkowitz S, et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. **Gastroenterology** 2007; 133:1099-105; quiz 1340-1.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nat Rev Immunol** 2013; 13:862-74.

Hu B, Elinav E, Huber S, et al. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:21635-40.

Huang Y, Liao H, Zhang Y, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ T cells in gastrointestinal cancers: a meta analysis. **PLoS One** 2014; 9:e94376.

Hussain SP, Amstad P, Raja K, et al. Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. **Cancer Res** 2000; 60:3333-7.

Hyun YS, Han DS, Lee AR, et al. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. **Carcinogenesis** 2012; 33:931-6.

[ILAS] Instituto Latino Americano de Sepsis. **Relatório nacional-protocolos gerenciados de sepse: Sepse grave e choque séptico 2005-2015**. Disponível em: <URL:www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional.pdf> [2016 set 22]

Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. **Cancer Res** 2001; 61:3573-7.

Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, et al. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. **Clin Exp Immunol** 2006; 146:330-8.

Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2004; 287:G7-17.

Jamieson T, Clarke M, Steele CW, et al. Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis. **J Clin Invest** 2012; 122:3127-44.

Jarvis JN. Pathogenesis and mechanisms of inflammation in the childhood rheumatic diseases. **Curr Opin Rheumatol** 1998; 10:459-67.

Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. **N Engl J Med** 1994; 331:213-21.

Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. **Science** 1991; 251:1366-70.

Kodani T, Rodriguez-Palacios A, Corridoni D, et al. Flexible colonoscopy in mice to evaluate the severity of colitis and colorectal tumors using a validated endoscopic scoring system. **J Vis Exp** 2013 (80):e50843.

Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol** 2013; 13:159-75.

Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. **Am J Gastroenterol** 2010; 105:501-23; quiz 524.

Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. **J Exp Med** 2007; 204:57-63.

Lee SH, Starkey PM, Gordon S. Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. **J Exp Med** 1985; 161:475-89.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. **Gut** 2011; 60:1739-53.

LI J, Liu Y, Wang B, et al. Myeloid TGF- $\beta$  signaling contributes to colitis-associated tumorigenesis in mice. **Carcinogenesis** 2013; 34:2099-108.

Lichtenstein GR, Hanauer SB, Sandborn WJ. Management of Crohn's disease in adults. **Am J Gastroenterol** 2009; 104:465-83; quiz 464, 84.

Liu H, Hu B, Xu D, Liew FY. CD4+CD25+ regulatory T cells cure murine colitis: the role of IL-10, TGF-beta, and CTLA4. **J Immunol** 2003; 171:5012-7.

Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. **Immunol Rev** 2010; 234:45-54.

Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. **Blood** 2005; 105:2862-8.

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:919-32.

Macrae FA. **Colorectal cancer: epidemiology, risk factors, and protective factors**. This topic last updated: Sep 09 2016. Available from: <URL:<https://www.uptodate.com/contents/colorectal-cancer-epidemiology-risk-factors-and-protective-factors>> [2016 set 25]

Maeda S, Hsu LC, Liu H, et al. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. **Science** 2005; 307:734-8.

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol** 2011; 11:519-31.

Martin M, Kesselring RK, Saidou B, et al. RORyt(+) hematopoietic cells are necessary for tumor cell proliferation during colitis-associated tumorigenesis in mice. **Eur J Immunol** 2015; 45:1667-79.

McCarty MF. Vegan proteins may reduce risk of cancer, obesity, and cardiovascular disease by promoting increased glucagon activity. **Med Hypotheses** 1999; 53:459-85.

Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. **J Clin Oncol** 2004; 22:3420-8.

Mei Z, Liu Y, Liu C, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. **Br J Cancer** 2014; 110:1595-605.

Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2005; 288:G1328-38.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2016 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology** 2012; 142:46-54.e42; quiz e30.

Monteleone G, Pallone F, Stolfi C. The dual role of inflammation in colon carcinogenesis. **Int J Mol Sci** 2012; 13:11071-84.

Moreno CC, Mittal PK, Sullivan PS, et al. Colorectal cancer initial diagnosis: screening colonoscopy, diagnostic colonoscopy, or emergent surgery, and tumor stage and size at initial presentation. **Clin Colorectal Cancer** 2016; 15:67-73.



Mota JM, Leite CA, Souza LE, et al. Post-sepsis state induces tumor-associated macrophage accumulation through CXCR4/CXCL12 and favors tumor progression in mice. **Cancer Immunol Res** 2016; 4:312-22.

Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. **J Immunol** 2003; 170:3939-43.

Nascimento DC, Alves-Filho JC, Sônego F, et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Crit Care Med** 2010; 38:1718-25.

Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. **Nat Protoc** 2007; 2:1998-2004.

Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol** 2014; 14:329-42.

Niess JH, Brand S, Gu X, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. **Science** 2005; 307:254-8.

Noti M, Corazza N, Mueller C, Berger B, Brunner T. TNF suppresses acute intestinal inflammation by inducing local glucocorticoid synthesis. **J Exp Med** 2010; 207:1057-66.

O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat Med** 2004; 10:801-5.

Odze R. Diagnostic problems and advances in inflammatory bowel disease. **Mod Pathol** 2003; 16:347-58.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature** 2001; 411:603-6.

Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, et al. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. **Int J Cancer** 2006; 118:2232-6.

Papanikolaou A, Shank RC, Delker DA, et al. Initial levels of azoxymethane-induced DNA methyl adducts are not predictive of tumor susceptibility in inbred mice. **Toxicol Appl Pharmacol** 1998; 150:196-203.

Park JH, Wacholder S, Gail MH, et al. Estimation of effect size distribution from genome-wide association studies and implications for future discoveries. **Nat Genet** 2010; 42:570-5.

Pastille E, Bardini K, Fleissner D, et al. Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. **Cancer Res** 2014; 74:4258-69.

Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. **J Biomed Biotechnol** 2012; 2012:718617.

Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, et al. KRAS-mutation status in relation to colorectal cancer survival: the joint impact of correlated tumour markers. **Br J Cancer** 2013; 108:1757-64.

Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2059-72.

Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, et al. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. **J Clin Invest** 2008; 118:560-70.

Prescott HC, Osterholzer JJ, Langa KM, Angus DC, Iwashyna TJ. Late mortality after sepsis: propensity matched cohort study. **BMJ** 2016; 353:i2375.

Restagno D, Venet F, Paquet C, et al. Mice survival and plasmatic cytokine secretion in a "Two Hit" model of sepsis depend on intratracheal pseudomonas aeruginosa bacterial load. **PLoS One** 2016; 11:e0162109.

Rex DK, Schoenfeld PS, Cohen J, et al. Quality indicators for colonoscopy. **Gastrointest Endosc** 2015; 81:31-53.

Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. **Oncogene** 2007; 26:3291-310.

Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. **Lancet** 2011; 377:31-41.

Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol** 2011; 32:452-60.

Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. **Cell Rep** 2015; 10:562-73.

Saito T, Nishikawa H, Wada H et al. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. **Nat Med** 2016; 22:679-84.

Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2576-82.

Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. **Nature** 2014; 513:564–8.

Schorr CA, Dellinger RP. The Surviving Sepsis Campaign: past, present and future. **Trends Mol Med** 2014; 20:192-4.

Sedhom MA, Pichery M, Murdoch JR, et al. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. **Gut** 2013; 62:1714-23.

Serr I, Fürst RW, Achenbach P, et al. Type 1 diabetes vaccine candidates promote human Foxp3(+)Treg induction in humanized mice. **Nat Commun** 2016; 7:10991.

Seymour CW, Rea TD, Kahn JM, et al. Severe sepsis in pre-hospital emergency care: analysis of incidence, care, and outcome. **Am J Respir Crit Care Med** 2012; 186:1264-71.

Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep** 2015; 5:15179.

Shang K, Bai YP, Wang C, et al. Crucial involvement of tumor-associated neutrophils in the regulation of chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. **PLoS One** 2012; 7:e51848.

Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol** 2008; 18:349-55.

Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. **Eur J Cancer** 2006; 42:717-27.

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA** 2016; 315:801-10.

Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. **Immunol Rev** 2005; 206:149-59.

Sônego F, Castanheira FV, Ferreira RG, et al. Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious. **Front Immunol** 2016; 7:155.

Teixeira LK, Fonseca BP, Barboza BA, Viola JP. The role of interferon-gamma on immune and allergic responses. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 2005; 100 Suppl 1:137-44.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2012. **CA Cancer J Clin** 2015; 65:87-108.

Umetani N, Sasaki S, Watanabe T, Shinozaki M, Matsuda K, et al. Genetic alterations in ulcerative colitis-associated neoplasia focusing on APC, K-ras gene and microsatellite instability. **Jpn J Cancer Res** 1999; 90:1081-7.

Victoria CR, Sassak LY, Nunes HR. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arq Gastroenterol** 2009; 46:20-5.

von Boehmer H, Daniel C. Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer. **Nat Rev Drug Discov** 2013; 12:51-63.

Vukasin AP, Ballantyne GH, Flannery JT, Lerner E, Modlin IM. Increasing incidence of cecal and sigmoid carcinoma Data from the Connecticut Tumor Registry. **Cancer** 1990; 66:2442-9.

Walkey AJ, Lagu T, Lindenauer PK. Trends in sepsis and infection sources in the United States a population-based study. **Ann Am Thorac Soc** 2015; 12:216-20.

Wang D, Dubois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. **Oncogene** 2010; 29:781-8.

Wang W, Li X, Zheng D, et al. Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model. **Mol Med Rep** 2015; 11:2397-406.

Wang Y, Han G, Wang K, et al. Tumor-derived GM-CSF promotes inflammatory colon carcinogenesis via stimulating epithelial release of VEGF. **Cancer Res** 2014; 74:716-26.

Wang Y, Wang K, Han GC, et al. Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. **Mucosal Immunol** 2014; 7:1106-15.

Ward JM, Treuting PM. Rodent intestinal epithelial carcinogenesis: pathology and preclinical models. **Toxicol Pathol** 2014; 42:148-61.

Watanabe N, Suzuki Y, Inokuchi S, Inoue S. Sepsis induces incomplete M2 phenotype polarization in peritoneal exudate cells in mice. **J Intensive Care** 2016; 4:6.

Wehrens EJ, van Wijk F, Roord ST, Albani S, Prakken BJ. Treating arthritis by immunomodulation: is there a role for regulatory T cells? **Rheumatology (Oxford)** 2010; 49:1632-44.

Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res** 1989; 49:3713-21.

Wen H, Dou Y, Hogaboam CM, Kunkel SL. Epigenetic regulation of dendritic cell-derived interleukin-12 facilitates immunosuppression after a severe innate immune response. **Blood** 2008; 111:1797-804.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res** 1980; 29:189-201.

Williams MD, Braun LA, Cooper LM, et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. **Crit Care** 2004; 8:R291-8.

Xu XR, Liu CQ, Feng BS, Liu ZJ. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol** 2014; 20:3255-64.

Xu Y, Hunt NH, Bao S. The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation. **Cell Res** 2008; 18:1220-9.

Yin J, Harpaz N, Tong Y, et al. p53 point mutations in dysplastic and cancerous ulcerative colitis lesions. **Gastroenterology** 1993; 104:1633-9.

Yurgelun MB, Goel A, Hornick JL, et al. Microsatellite instability and DNA mismatch repair protein deficiency in Lynch syndrome colorectal polyps. **Cancer Prev Res (Phila)** 2012; 5:574-82.

Zhang Q, Wu Y, Wang J, et al. Accelerated dysbiosis of gut microbiota during aggravation of DSS-induced colitis by a butyrate-producing bacterium. **Sci Rep** 2016; 6:27572.

Zhao J, Cao Y, Lei Z, et al. Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. **Cancer Res** 2010; 70:4850-8.

Zhu J, Yang F2, Sang L, et al. IL-33 Aggravates DSS-induced acute colitis in mouse colon lamina propria by enhancing Th2 cell responses. **Mediators Inflamm** 2015; 913041.

Zhu W, Yu J, Nie Y, et al. Disequilibrium of M1 and M2 macrophages correlates with the development of experimental inflammatory bowel diseases. **Immunol Invest** 2014; 43:638-52.



**Anexo 1 - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais -  
FMRP - USP**



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
Comissão de Ética no Uso de Animais – FMRP - USP  
3602-3301

***CERTIFICADO***

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 195/2013, sobre o projeto intitulado “*Câncer colorretal no pós-sepse: papel de linfócitos e reguladores na modulação de macrófagos associados ao tumor*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Fernando de Queiroz Cunha** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 26 de fevereiro de 2014.

We certify that the protocol nº 195/2013, entitled “*Colorectal cancer in postsepsis: role of regulatory lymphocytes in modulation of tumor-associated macrophages*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 02/26/2014.

Ribeirão Preto, 26 de fevereiro de 2014.

A handwritten signature in black ink, reading 'Alceu Afonso Jordão Júnior'. The signature is written in a cursive, flowing style.

**Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior**  
*Vice-Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal, em exercício*

**Anexo 2 – Planejamento experimental com número total de animais utilizados**

