



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

MARAIZA ALVES TEIXEIRA

**PAPEL DE RECEPTORES CXCR2 NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO**

FORTALEZA

2015

MARAIZA ALVES TEIXEIRA

**PAPEL DE RECEPTORES CXCR2 NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- T267p Teixeira, Maraiza Alves.
 Papel de receptores CXCR2 na mucosite intestinal induzida por Irinotecano./ Maraiza Alves
 Teixeira. – 2015.
 92 f.: il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
 Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
 Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
 Área de Concentração: Farmacologia.
 Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. Mucosite. 2. Mucosa Intestinal. 3. Receptores de Interleucina-8B. I. Título.

CDD 616.994347

MARAIZA ALVES TEIXEIRA

**PAPEL DE RECEPTORES CXCR2 NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/ 2015.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Diego Veras Wilke
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

DEDICATÓRIA

À minha maior fonte de inspiração, de amor ao próximo, de resiliência: a minha querida mãe Aurilene.

Ao professor e amigo, Dr. Ronaldo Ribeiro, por ter se dedicado à ciência com amor e excelência. Exerceu brilhantemente os papéis de médico, pesquisador e professor. Seu legado continuará influenciando gerações futuras, imortalizando-o. Sentiremos saudades!

(In Memoriam)

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque Ele é justo e eterna é a sua misericórdia.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Roberto César Pereira Lima Júnior**, por ser um excelente exemplo de líder. Um homem íntegro que caminha ao lado dos seus estudantes, que orienta com paciência e que se dedica a ciência com amor. Muito obrigada.

Ao querido Prof. Dr. **Fernando de Queiróz Cunha** por ter disponibilizado seu laboratório na FMRP/USP, permitindo assim o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pelos valiosos ensinamentos que muito contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**, pelas importantes contribuições dadas a esse trabalho e por ter conduzido o LAFICA com dedicação e maestria (In Memoriam).

À pós-doutoranda **Deysi Wong** pela paciência e pelo zelo em compartilhar seus conhecimentos. Obrigada pela amizade.

Ao amigo e doutorando **Caio Abner** pela valiosa ajuda nos experimentos realizados em Ribeirão Preto/SP.

A **Camila Fernandes**, por ser prestativa e companheira. Obrigada pelas ajudas nos experimentos até aos domingos.

A todos os amigos do LAFICA, especialmente **Amilcar Dornellas, Ana Paula Macêdo, Anielle Torres, Camila Meirelles, Carlos Wagner, Daniel Gurgel, Diego Holanda, Enzo Albuquerque, Fábio Bezerra, Karol Saboia, Livia Nobre, Livia Talita, Lucas Carvalho, Lucas Nicolau, Renan Oliveira, Venúcia Magalhães** pelo agradável convívio e momentos de amizade compartilhados durante esta jornada.

Aos amigos do Laboratório de Inflamação e Dor (LID/FMRP), em especial a **Vanessa Borges, Fernanda Castanheira e David Colón** pelas inestimáveis ajudas na execução dos experimentos.

A todos os demais integrantes do LID, especialmente **Alexandre Kanashiro, André Saraiva, Annie Pineros, Cássia Silva, David Ferreira, Douglas Prado, Flávia Santa Cecília, Flávio Protássio, Guilherme, João Paulo Mesquita, Kalil Alves, Marcela Davioli, Maria Cláudia, Miriam Fonseca, Paula Viacava, Paulo Henrique, Rafael Ferreira, Rangel Leal, Raphael Sanches, Taty Cecilio**, obrigada pela amizade, pelas discussões científicas nos

corredores, pelas festas, pela acolhida. Vocês foram sensacionais e tornaram meus dias em Ribeirão mais leves.

A minha querida amiga americana **Kacy Brubaker**, pela enriquecedora amizade.

Ao meu pai **José Mauricio** e aos meus irmãos **Mauzirene, Marillia, Murilo e Olga**.

Aos meus sobrinhos **Luiza Luz e Benício Luz**, os amores da titia.

Ao meu cunhado **Elton Lopes**, por ser um verdadeiro irmão.

Às amigas que me acolheram em Ribeirão e me proporcionaram momentos felizes: **Ana Débora, Camila Silva e Rebeca Pessoa**.

A técnica do LAFICA, a querida **Vandinha França Pinheiro** pela competência e organização em suas condutas no laboratório.

Aos técnicos **Ana Kátia dos Santos, Diva Amábile, Giuliana Bertozi, Ieda Regina Schivo, Sérgio Roberto Rosa**, todos da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, obrigada pelo suporte experimental em Ribeirão.

Ao **CNPq, CAPES e FUNCAP** pelo apoio financeiro.

A todos que participaram direta ou indiretamente em alguma etapa para a realização desse trabalho.

*“Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante
do que ter aquela velha opinião formada sobre
tudo”*

(Raul Seixas)

RESUMO

Introdução: O irinotecano é um antineoplásico usado no tratamento de primeira e segunda linha do câncer colorretal. No entanto, um importante efeito colateral associado ao irinotecano, a mucosite intestinal, tem impactado negativamente na qualidade de vida dos pacientes e no sucesso terapêutico. Trabalhos anteriores demonstraram que na patogênese da mucosite intestinal há a participação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-18, IL-33, óxido nítrico dentre outros, cuja modulação leva à redução do infiltrado neutrofílico no intestino e melhora do dano tecidual. Entretanto, o papel de receptores de quimiocinas, como o CXCR2, importantes no recrutamento de neutrófilos, ainda não foram investigados no contexto da mucosite. **Objetivos:** Avaliar o papel de receptores CXCR2 na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano. **Métodos:** Camundongos C57BL/6 machos, 18-25g, foram divididos em grupos (n=6), administrados por 4 dias com salina (5mL/kg, i.p) ou com irinotecano (75, 90, 105 ou 120 mg/kg, i.p). A dose de 120 mg/kg foi a que melhor reproduziu o quadro inflamatório característico da mucosite, sendo então utilizada nos ensaios posteriores em associação ao SB225002, um antagonista de receptores CXCR2. Os animais foram analisados quanto ao peso corpóreo, escores de diarreia, contagem de leucócitos. Após a eutanásia, uma amostra de intestino foi coletada para análise histopatológica e morfométrica, dosagem de mieloperoxidase e níveis de IL-1 β , IFN- γ e KC. Além disso, o comprimento do intestino delgado foi mensurado, bem como o peso do conteúdo sólido. Avaliou-se também a bacteremia. Adicionalmente, realizou-se a quantificação dos receptores CXCR2 e CCR2, além do ensaio de quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos isolados de camundongos tratados com IRI ou com IRI+SB225002. (Protocolo CEPA 58/14). **Resultados:** O IRI em todas as doses avaliadas promoveu uma significativa ($P<0,05$) perda ponderal e leucopenia. Sendo que, apenas as doses de 105 e 120 mg/kg foram capazes de reduzir de forma significativa ($P<0,05$) a razão vilo/cripta e de aumentar ($P<0,05$) o infiltrado neutrofílico (ensaio de MPO). Nenhuma das doses avaliadas promoveu diarreia nos camundongos desse experimento. A dose de 120 mg/kg foi que a melhor reproduziu o dano histopatológico típico da mucosite intestinal, sendo a dose escolhida para as demais análises. O uso do antagonista dos receptores CXCR2, o SB225002, associado ao IRI não protegeu os animais da perda de peso, da leucopenia, do dano histopatológico (mensurado pela razão vilo/cripta), da redução do comprimento do intestino delgado nem da redução do peso do conteúdo do delgado. Todos esses parâmetros apresentaram-se de forma semelhante nos animais tratados apenas com IRI ou em associação IRI+SB225002. Quanto ao infiltrado neutrofílico, observamos que o uso do SB225002 no D2, 24h após a 1ª administração do IRI, foi capaz de reduzir a atividade da MPO ($P<0,05$). Tal redução não foi observada nos tempos subsequentes. Observou-se que o tratamento com irinotecano levou à internalização de CXCR2 e aumento da expressão do CCR2 nos neutrófilos de animais tratados com o antineoplásico. Houve, ainda, uma redução da migração de neutrófilos do quinto para o sétimo dia após a injeção do IRI. Corroborando com esse dado, houve redução da migração dos neutrófilos (isolados da medula óssea de camundongos tratados com irinotecano) ao MIP-2, um ligante de CXCR2. Observamos, ainda, que os camundongos injetados com IRI apresentaram bacteremia, quando comparados ao grupo salina. **Conclusão:** O receptor CXCR2 participa somente da fase precoce da mucosite intestinal, provavelmente devido a uma internalização deste receptor, o qual é substituído pelo CCR2 na superfície dos neutrófilos.

Palavras-chave: Irinotecano, mucosite, receptores quimiotáticos, CXCR2, SB225002.

THE ROLE OF CXCR2 RECEPTORS IN INTESTINAL MUCOSITIS INDUCED BY IRINOTECAN

ABSTRACT

Introduction: Irinotecan is an anticancer agent used in first and second line treatment protocols for colorectal cancer. However, a major side effect associated with irinotecan, intestinal mucositis, has negatively impacted on patient's quality of life and limiting the therapeutic outcome. The literature reports the involvement of several inflammatory mediators in the pathogenesis of intestinal mucositis, including IL-1, IL-18, IL-33, nitric oxide and several others, whose pharmacological inhibition prevents neutrophil infiltration and leads to mucositis improvement. However, the role of chemokine receptors that are important to neutrophil recruitment, such as CXCR2, in intestinal mucositis is unknown. **Aims:** To study the role of CXCR2 receptors in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **Methods:** Male C57BL/6 mice (n = 6) were divided into groups and injected with either saline (5ml / kg, ip) or irinotecan (75, 90, 105 or 120 mg/kg ip) for 4 days. The dose of 120 mg/kg reproduced the inflammatory condition of mucositis, so it was used in association with SB225002, a CXCR2 antagonist. Body mass variation, diarrhea scores and leukocyte count were recorded. Following euthanasia, intestinal samples were collected for histopathological analysis, mieloperoxidase activity (MPO), IL-1 β , KC and IFN- γ levels. In addition, the length of the small intestine was measured so was the weight of its solid contents. Bacteremia was further carried out. Additionally, we measured the expression of CXCR2 and CCR2 receptors on neutrophils surface. We also performed the in vitro chemotaxis assay, using neutrophils isolated from bone marrow of mice treated with IRI or IRI + SB225002 (Study approval number: 58/14). **Results:** IRI produced a significant ($P < 0.05$) weight loss and leukopenia in all doses tested. However, only the doses of 105 and 120 mg/kg reduced ($P < 0.05$) the villus/crypt ratio and increased ($P < 0.05$) neutrophil infiltration (MPO assay). None of the doses promoted diarrhea. The dose of 120 mg/kg was the best in reproducing the typical histopathological damage seen during intestinal mucositis, thus this dose was chosen for further analysis. The treatment with SB225002 did not protect the animals from the weight loss, leukopenia, histopathological damage (measured by the villus/crypt ratio), reduction of the small intestine length or weight reduction of the small intestine content induced by IRI. There was no difference between IRI or IRI + SB225002 groups in regard to these parameters. In regard to neutrophil infiltration, SB225002 prevented the increase in MPO activity as early as 24 hours post 1st dose of IRI ($P < 0.05$) vs IRI group, but failed to do so in late mucositis. In addition, IRI led to CXCR2 internalization followed by an increased expression of CCR2 receptor on neutrophils harvested from IRI-treated mice. Accordingly, in vitro neutrophil migration towards MIP-2, a CXCR2 ligand, was reduced. We also observed that mice injected with IRI or SB225002+IRI showed bacteremia when compared to the saline group. **Conclusion:** CXCR2 receptors only participate in the early phases of intestinal mucositis, likely due to the downregulation of these receptors, which are replaced by CCR2 on the surface of neutrophils.

Keywords: Irinotecan, mucositis, chemotactic receptors, CXCR2, SB225002.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Topoisomerasas I e II como alvo de fármacos.....	19
Figura 2 -	Metabolismo do Irinotecano.....	20
Figura 3 -	Quimiocinas e seus receptores.....	29
Figura 4 -	Grupos experimentais: curva dose-resposta	36
Figura 5 -	Grupos experimentais: uso do SB225002	37
Figura 6 -	Avaliação dos escores de diarreia pós-injeção do Irinotecano em camundongos C57BL/6.....	38
Figura 7 -	Efeito da injeção de diferentes doses de irinotecano sobre a variação percentual de massa corpórea em função do tempo	47
Figura 8 -	Efeito da injeção de diferentes doses de IRI sobre os escores de diarreia em camundongos C57BL/6.....	48
Figura 9 -	Fotomicrografias de amostras de íleo após a injeção de diferentes doses de irinotecano em camundongos C57BL/6	49
Figura 10 -	Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfológica em segmentos intestinais (íleo)	50
Figura 11 -	Curva dose-resposta do IRI sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais (íleo) de camundongos C57BL/6	51
Figura 12 -	Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos totais em camundongos C57BL/6	52
Figura 13 -	Efeito do tratamento com SB225002 sobre a variação da massa corpórea em função do tempo	53
Figura 14 -	Fotomicrografias de amostras de íleo após bloqueio de receptores CXCR2	55
Figura 15 -	Efeito do bloqueio de receptores CXCR2 sobre a razão vilos/cripta intestinal.....	56

Figura 16 - Efeito do SB225002 sobre o comprimento do intestino delgado (cm) durante a mucosite intestinal	57
Figura 17 - Efeito do bloqueio de receptores CXCR2 sobre o peso do conteúdo sólido no intestino delgado.....	58
Figura 18 - Efeito do SB225002 sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais (íleo)	60
Figura 19 - Efeito do IRI em diferentes tempos sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais (íleo) de camundongos C57BL/6	61
Figura 20 - Efeito do tratamento com o SB225002 sobre os níveis de citocinas (KC, IL-1 β e IFN- γ) no íleo de camundongos C57BL/6.....	63
Figura 21 - Efeito do irinotecano, isolado ou associado ao SB225002, na internalização de receptores CXCR2 em neutrófilos	65
Figura 22 - Efeito do irinotecano sobre a expressão de receptores CXCR2 e CCR2 na superfície de neutrófilos	66
Figura 23 - Efeito do irinotecano ou da associação SB225002 e irinotecano sobre a quimiotaxia de neutrófilos isolados da medula óssea	68
Figura 24- Efeito do tratamento com o SB225002 sobre a contagem de bactérias no sangue	69
Figura 25- Efeito do SB225002 sobre a contagem total de leucócitos em camundongos C57BL/6	70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Escores de avaliação da diarreia em camundongos.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CLP	Ligação e Perfuração do Ceco
CCR	Câncer coloretal
CPT-11	Irinotecano
C57BL/6	Camundongos <i>Imbred</i> da espécie C57BL/6
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
E.P.M	Erro padrão da média
FITC	Isoticianato de fluoresceína
H&E	Hematoxilina & Eosina
H2O2	Água Oxigenada
HTAB	Hexadecitrimetilamônio
i.p	Intraperitoneal
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-18	Interleucina-18
IRI	Irinotecano
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro

NaCl	Cloreto de Sódio
NO	Óxido Nítrico
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
PBS	Tampão salina fosfato
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio de cultura para células 1640
SB	SB225002 (inibidor dos receptores CXCR2)
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator de crescimento e transformação β
WT	Animais selvagens (<i>Wide-type</i>) C57BL/6

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
-/-	Nocaut
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
g	Gramas
kg	Quilogramas
M	Molar (concentração)
mg	Miligramas
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
<	Menor que
>	Maior que
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido	18
1.1	IRINOTECANO.....	Erro! Indicador não definido	18
1.2	MUCOSITE INTESTINAL POR ANTINEOPLÁSICOS.....		21
1.3	O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS	Erro!	
	Indicador não definido		25
1.3.1	Falência da migração de neutrófilos em condições patológicas sistêmicas		26
1.4	QUIMIOKINAS		28
2	OBJETIVOS		32
2.1	GERAL:		32
2.2	ESPECÍFICOS:		32
3	MATERIAL E MÉTODOS		33
3.1	ANIMAIS.....		33
3.2	ASPECTOS ÉTICOS		33
3.3	EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS LABORATORAIS.....		33
3.4	DROGAS, SOLUÇÕES E CORANTES		34
3.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....		35
3.5.1	INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL	Erro! Indicador não definido	35
3.5.2	MODULAÇÃO DE RECEPTORES CXCR2 COM O ANTAGONISTA SB225002		37
3.5.3	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DA INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO.....		38
3.5.4	MENSURAÇÃO DO TAMANHO DO INTESTINO DELGADO E PESO DO LAVADO DO CONTEUDO INTESTINAL		41
3.5.5	DOSAGEM DE CITOCINAS KC, IL-1 β E IFN- γ NA MUCOSITE INTESTINAL		41
3.5.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CCR2 E CXCR2 POR CITOMETRIA DE FLUXO		42
3.5.7	ENSAIO DE QUIMIOTAXIA COM A CÂMARA DE BOYDEN		44
3.5.8	AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO		45
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA		45
4	RESULTADOS		46
4.1	PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE IRINOTECANO PARA INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL		46
4.1.1	Avaliação ponderal.....		46

4.1.2	Avaliação dos escores de diarreia	47
4.1.3	Análises histopatológicas de segmentos de intestino delgado (íleo)	48
4.1.4	Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	50
4.1.5	Contagem total de leucócitos	52
4.2	USO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CXCR2, O SB225002, NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO.....	52
4.3	QUANTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 E CCR2 E ENSAIO DE QUIMIOTAXIA	64
4.4	AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA E DA LEUCOPENIA APÓS INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO	69
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÃO	81
7	REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1 Irinotecano

O irinotecano (CPT-11) é um derivado solúvel e semissintético da camptotecina. A camptotecina é um alcaloide pentacíclico proveniente da *Camptotheca acuminata*, uma planta nativa na China e no Tibet, tendo sido inicialmente isolada nos Estados Unidos, por WALL e colaboradores, em 1966.

Estudos da década de 1970 mostravam que a camptotecina tinha uma potente atividade antitumoral, mas também estava associada a severas toxicidades, além de ter reduzida solubilidade. Após a realização de vários ensaios na tentativa de sintetizar derivados menos tóxicos, compostos como o topotecano e o irinotecano foram identificados (ARMAND *et al.*, 1995). O topotecano e o irinotecano foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), em 1996, para o tratamento de câncer de ovário recorrente e câncer de cólon, respectivamente (Revisto por CHEN *et al.*, 2012).

Devido a seu grande efeito anticâncer, o irinotecano foi incorporado em vários protocolos de quimioterapia, como no tratamento de primeira e de segunda linha dos cânceres colorretal, gástrico, pulmão pequenas-células e não-pequena células, linfoma de Hodgking, leucemia, ovário, mama e de estômago (XU *et al.*, 2002).

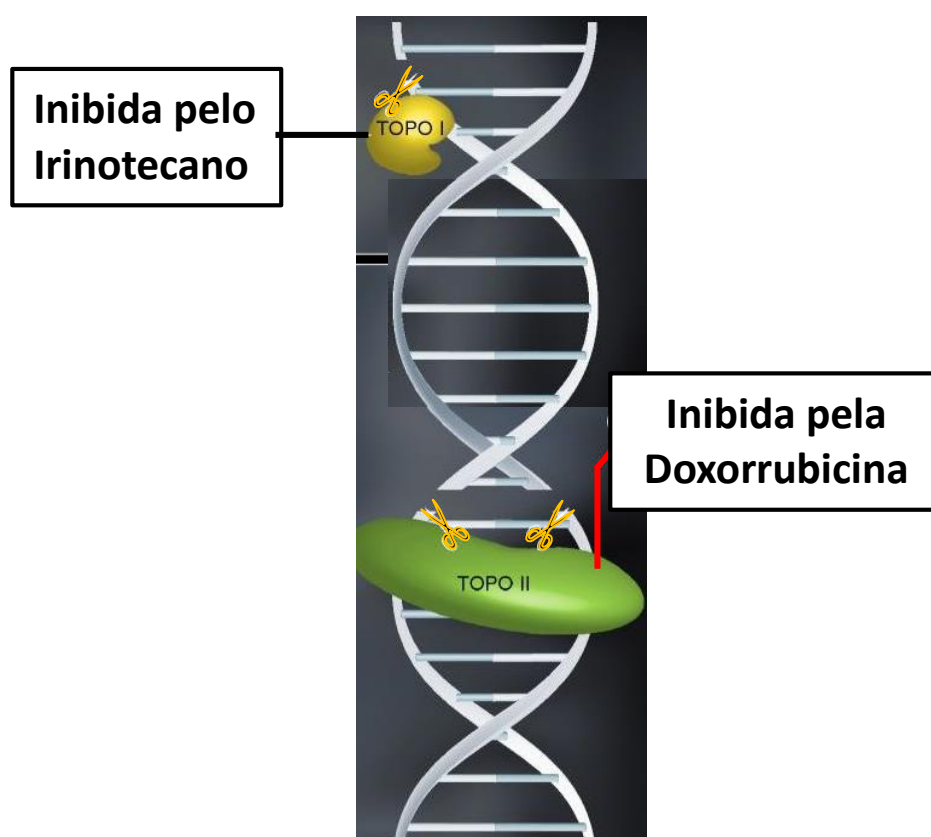
Entre 1966 e 2012, mais de 5.000 publicações (jornais, artigos e patentes) sobre a camptotecina foram contabilizados. Este número dramático de publicações reflete a intensa pesquisa nesse campo durante esses quase 50 anos (LIU & YING-QIAN, 2015).

O irinotecano é um inibidor seletivo da topoisomerase I (**Figura 1**). Esta, por sua vez, atua sobre a dupla fita de DNA relaxando a tensão da torção gerada durante a fase de transcrição e replicação do DNA (WANG, 1996). Devido ao tamanho do cromossomo eucariótico, a remoção da supertorção se faz necessária e é realizada através da introdução de quebras transitórias em uma das cadeias da dupla fita de DNA, o que permite que a cadeia que foi quebrada gire em torno da fita complementar intacta e a supertorção consequentemente seja removida. Após o relaxamento, a ligação intermediária covalente entre a topoisomerase I e o DNA se desfaz, sendo a taxa de religação da fita clivada normalmente mais rápida que a taxa de clivagem (CHAMPOUX, 2001). Uma variedade de drogas tem capacidade, tanto *in vivo* como *in vitro*, de estabilização do intermediário covalente topoisomerase I-DNA, como, por exemplo, o topotecano e o irinotecano. A

topoisomerase I é, portanto, o alvo molecular da ação desses agentes, sendo os efeitos citotóxicos, consequentemente, fase S específicos.

O complexo contendo DNA, topoisomerase I e irinotecano colide com as fitas em replicação, o que acontece apenas em células com alta taxa de divisão, como as tumorais, por exemplo, levando o DNA a sofrer rupturas com consequente ativação da apoptose celular (**Figura 1**).

Figura 1: Topoisomerases I e II como alvo de fármacos.



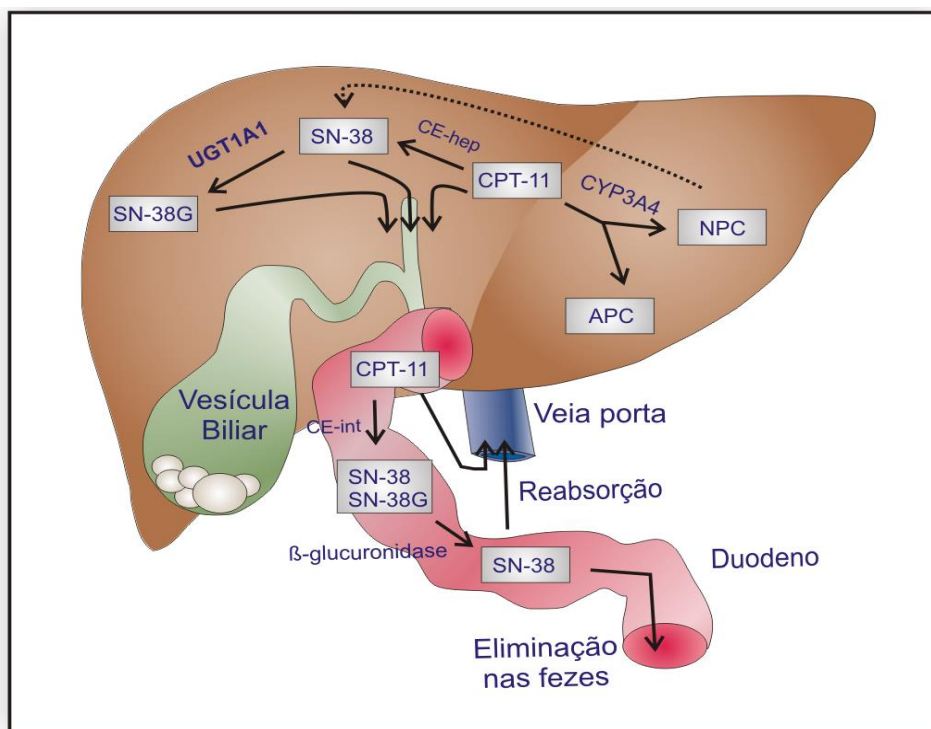
As enzimas topoisomerase I (TOPO I) e II (TOPO II) atuam reduzindo a supertorção gerada durante a replicação do DNA realizando, respectivamente, cortes em uma ou nas duas fitas do DNA. Fármacos antineoplásicos podem atuar como inibidores de topoisomerases, como, por exemplo, o irinotecano, um inibidor de TOPO I, e a doxorubicina, que inibe a TOPO II. Fonte: Adaptado de SANCHIS *et al.*, 2010.

O irinotecano é uma pró-droga cuja metabolização hepática gera o composto ativo SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina). Os estudos bioquímicos e análises de citotoxicidade realizados *in vitro* em células tumorais humanas e de roedores indicam, de forma consistente, que o SN-38 é, pelo menos, 1000 vezes mais potente como um inibidor

de topoisomerase I do que o irinotecano (TAKIMOTO, ARBUCK, apud KOIZUMI *et al.*, 2006).

A conversão do irinotecano no seu metabólito ativo, SN-38 se dá pela ação da enzima carboxilesterase (CE) hepática (**Figura 2**). A CE se encontra presente abundantemente no fígado e em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. O SN-38 é formado a partir do irinotecano, por clivagem da ligação de carbamato entre a fração camptotecina e a cadeia lateral dipiperidina mediada por uma carboxilesterase (GUICHARD *et al.*, 1999; ALIMONTI *et al.*, 2004). Posteriormente, o SN-38 sofre glucoronização pela enzima uridina difosfato glucoronil-transferase – 1A1 (UDP-GT 1A1) ao SN38 glucoronídeo (SN38G), que é inativo (**Figura 2**).

Figura 2: Metabolismo do Irinotecano



No fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o CPT-11 gerando dois compostos inativos, APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela carboxilesterase (CE) em SN-38. A depuração do SN-38 é feita no fígado pelo polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1), gerando glicuronídeos de SN-38 (SN-38G), que são desprovidos de atividade biológica. CPT-11, SN-38 e SN-38G são excretados na bile e chegam ao intestino delgado. No intestino delgado, o CPT-11 pode ser clivado pela CE intestinal, formando mais SN-38. Além disso, o SN-38G pode ser desconjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de β -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido iniciando um processo de recirculação entero-hepática (TAKASUNA *et al.*, 1998; CHESTER *et al.*, 2003; TALLMAN, 2005).

A eliminação do irinotecano é realizada principalmente através das fezes (60-70%), sendo também excretada pela bile (25%) e urina (10-20%) (ALIMONTI *et al.*, 2004). No intestino, uma parte do fármaco é reativado em SN-38 por bactérias intestinais produtoras de β -glicuronidasas (como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*) completando o ciclo entero-hepático do fármaco (TAKASUNA *et al.*, 1998).

Os efeitos adversos comuns observados com a administração do irinotecano incluem diarreia, neutropenia, síndrome colinérgica precoce, náusea e vômito, alopecia e astenia. No entanto, os efeitos tóxicos dose limitantes são diarreia grave e neutropenia (CUNNINGHAM *et al.*, 1998; CHESTER *et al.*, 2003). Estudos clínicos mostram que o irinotecano causa diarreia em até 80% dos pacientes, sendo esta de graus 3 e 4 em aproximadamente 25% destes (KEEFE *et al.*, 2007). Quanto à leucopenia, o manejo é mais facilmente realizado através da administração de fatores estimuladores de colônia de granulócitos (G-CSF) (ALIMONTI *et al.*, 2004).

A ação desses antineoplásicos não se limita somente às células neoplásicas, por isso essas drogas podem atuar em células normais tendo como resultado importantes efeitos colaterais que em certas situações podem determinar desde a redução do esquema terapêutico como a sua total interrupção, assim, podendo trazer grande prejuízo na eficácia do tratamento oncológico (FILICKO *et al.*, 2003; CALABRESI & CHABNER, 2003).

Dentre os eventos adversos causados pelo irinotecano, a mucosite intestinal tem sido uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), sendo, portanto, o nosso objeto de estudo.

1.2 Mucosite intestinal por antineoplásicos

Por definição, a mucosite alimentar ou gastrointestinal é o termo clínico usado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral ou mucosa intestinal). Esta síndrome, a depender da gravidade, caracteriza-se por ulceração da mucosa do trato digestivo, podendo resultar em dor, disfagia, diarreia e disfunção, de acordo com o tecido afetado (SONIS *et al.*, 2004; SONIS & FAY, 2002; SCULLY & SONIS, 2006).

Por serem os agentes citotóxicos mais efetivos em tecidos com alta taxa proliferativa, o epitélio do trato gastrointestinal, pela sua elevada taxa de renovação celular, torna-se particularmente susceptível aos efeitos danosos dos antineoplásicos (PARRILLI *et al.*, 1989).

SONIS e colaboradores descreveram a mucosite oral por antineoplásicos como um processo complexo, no qual ocorre a seguinte sequência de eventos biológicos interligados: iniciação, resposta primária ao dano, sinalização (e amplificação), ulceração e, finalmente, cicatrização (SONIS *et al.*, 2004; SCULLY & SONIS, 2006).

Acreditava-se que a radiação ou quimioterapia destruíam as células basais, elas paravam de se dividir, o epitélio não era renovado, a atrofia se desenvolvia e, como consequência, surgia a ulceração. Mas algumas coisas não se encaixavam. E a extensão do dano epitelial, causado pela mucosite, não poderia ser explicado cineticamente baseado apenas como consequência da morte de células basais (PARIS *et al.*, 2001).

O reconhecimento de que a mucosite evolui, não só devido a lesão celular diretamente mediada pela quimioterapia ou radiação, mas sobretudo como consequência de uma complexa cascata de eventos biológicos, tem permitido a descoberta de importantes marcadores envolvidos no processo. No entanto, as etapas do mecanismo que levam à lesão precisam ser melhor elucidadas (SONIS, 2010).

Estudos realizados no LAFICA vem contribuindo para a compreensão dos mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG, 2013; GUABIRABA *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015).

Nesse contexto, observou-se que a administração de irinotecano em camundongos cursa com uma significativa perda ponderal, diarreia, diminuição das vilosidades intestinais e perda da arquitetura das criptas, aumento de infiltrado inflamatório e de contratilidade da musculatura lisa intestinal. Em nossos estudos verificamos que as citocinas TNF- α , IL-1 β e KC (quimiocina murina análoga à IL-8 humana), são importantes mediadores na patogênese da mucosite intestinal. A modulação desses mediadores com Talidomida, um inibidor seletivo do TNF- α , e com Pentoxifilina, inibidor inespecífico de citocinas, reduziu significativamente as lesões intestinais induzidas pelo irinotecano, diminuindo o infiltrado neutrofílico (detectado pela atividade da mieloperoxidase) e diminuindo o dano na arquitetura do epitélio intestinal. Foi

observada uma redução na severidade da diarreia induzida pelo irinotecano, especificamente associada a Pentoxifilina (MELO *et al.*, 2008).

Posteriormente, foi investigado o papel específico de diversas citocinas e do óxido nítrico (NO) na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014). Dessa forma, demonstrou-se que na mucosite intestinal por irinotecano, mediadores como o TNF- α , óxido nítrico (NO), caspase 1, a interleucina 18 (IL-18) e interleucina 33 (IL-33) contribuem para a formação das lesões da mucosa observadas em camundongos injetados com irinotecano.

Verificou-se, ainda, que a administração de irinotecano resulta no aumento da imunomarcagem da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em células epiteliais duodenais e em leucócitos infiltrantes na lâmina própria. Este aumento foi prevenido pelo uso da pentoxifilina ou do infliximab (anticorpo anti-TNF- α), sugerindo que a indução de iNOS representa uma etapa posterior e dependente da sinalização de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β . Adicionalmente, animais tratados com aminoguanidina, um inibidor da iNOS, assim como os animais com deleção do gene para esta enzima (*knockout* para iNOS) mostraram prevenção das alterações morfológicas, evidenciada pela não diminuição da razão vilo/cripta em ambos os grupos. A deleção gênica de iNOS ou o bloqueio farmacológico dessa enzima, implicou na redução parcial da produção local de IL-1 β e KC, além de ter prevenido o aumento do infiltrado neutrofílico e atuado como fator protetor contra alterações funcionais, tendo diminuído, significativamente, a responsividade do duodeno à acetilcolina (ACh), quando comparado ao grupo irinotecano-selvagem (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Além disso, LIMA-JÚNIOR e colaboradores (2014) demonstraram o envolvimento da via caspase-1/IL-18 na mucosite intestinal induzida por irinotecano, visto que há aumento local da produção desta citocina, possivelmente por macrófagos da lâmina própria, e que a deleção genética desta ou a inibição farmacológica com IL-18bp (proteína ligante de IL-18) implica na prevenção das alterações morfológicas, funcionais e inflamatórias, como a diarreia e o infiltrado inflamatório. Observou-se também, nesses animais, que a atividade da iNOS é reduzida, portanto, com menor síntese de NO corroborando com os resultados anteriores (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

WONG (2013) e WONG *et al* (2015) verificaram a presença de translocação bacteriana para órgãos periféricos como, por exemplo, o fígado, no curso da lesão intestinal induzida pelo irinotecano. Adicionalmente, observaram também que a deficiência de receptores Toll-like do tipo 2, assim como da proteína adaptadora MyD88, envolvida na sinalização de receptores Toll, previniu a ativação do NFκB, a produção de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento do dano intestinal e da diarreia (WONG *et al.*, 2015). Contudo, a deficiência dos receptores NOD1 e TLR9 somente melhoram, respectivamente, a diarreia e o processo inflamatório, relacionados ao irinotecano (WONG, 2013). Também foi mostrado, no modelo de alça isolada, que a presença de infiltrado neutrofilico intestinal era causado pelo efeito direto do SN-38 (o metabólito ativo do irinotecano) o que pode reforçar a ideia de que o SN-38 possa, além de ser o agente indutor do efeito citotóxico antitumoral, ser também, o indutor das alterações lesivas intestinais.

ARIFA e colaboradores (2014) demonstraram que as espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas com o uso de irinotecano, eram derivadas de NADPH oxidase (NOX-2) e tinham papel crucial para a ativação de caspase-1, com consequente produção de IL-1β e IL-18, durante a mucosite intestinal. Também verificaram que a ausência de componentes do inflamossomo levavam à diminuição do dano intestinal, atenuação da perda de peso e diminuição da resposta inflamatória após a administração do irinotecano. Os autores demonstraram que a produção de ROS (derivadas de NOX-2), levavam à ativação do inflamossomo, produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β e IL-18) com o consequente dano tecidual característico da mucosite (ARIFA *et al.*, 2014).

Uma outra citocina, descrita como membro da família de IL-1, a IL-33 (SCHMITZ *et al.*, 2005), parece estar relacionada com o desenvolvimento de uma resposta biológica moduladora, via sinalização do receptor ST2. Contudo, nosso grupo demonstrou que o dano intestinal e a diarreia grave induzidas pelo irinotecano podem ser mediados pela interleucina-33 (IL-33). Neste trabalho a lesão da mucosa, diarreia, e perda de peso corporal foram concomitantes com a indução de IL-33 no intestino delgado de camundongos injetados com irinotecano. Sendo estes efeitos marcadamente reduzidos em animais knockout para o receptor de IL-33 (ST2^{-/-}). Além disso, a IL-33 recombinante exacerbou a mucosite pelo aumento do recrutamento de neutrófilos, ao passo que o bloqueio da IL-33 com a forma solúvel do receptor da IL-33 (ST2 solúvel) marcadamente atenuaram a doença (GUABIRABA *et al.*, 2014).

Em todos esses trabalhos anteriores, demonstrou-se que a modulação de IL-18, IL-33, receptores Toll-like, óxido nítrico, dentre outros mediadores alvo, leva à redução do infiltrado neutrofílico no intestino e melhora do dano tecidual associado à mucosite. Entretanto, o papel de receptores de quimiocinas, como o CXCR2, importantes no recrutamento de neutrófilos, ainda não foram investigados no contexto da mucosite.

Assim, fazem-se necessários estudos mais aprofundados sobre a patogênese da mucosite intestinal por antineoplásicos, de forma que os pacientes acometidos com essa reação adversa tenham melhorias na qualidade de vida.

1.3 O processo inflamatório e a migração de neutrófilos

A inflamação é uma resposta fundamentalmente protetora, destinada a livrar os organismos tanto da causa inicial da lesão celular (micro-organismos, toxinas), quanto das consequências de tal injúria (células e tecidos necróticos). A resposta inflamatória coordena as reações dos vasos, leucócitos e proteínas plasmáticas para alcançar esse objetivo (ABBAS *et al.*, 2010).

Tal resposta tem sido mais bem caracterizada nas infecções bacterianas, por exemplo, onde o início da resposta se dá pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) presentes nas células residentes.

Os PRRs também reconhecem os Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) presentes nas células residentes. Os DAMPs são chamados de alarminas e podem ser representadas por constituintes da matriz extracelular degradados por proteases provenientes das células lesionadas ou necróticas, por citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-18 e IL-33) sintetizadas por estas e por elementos antes isolados do meio extracelular por membranas, como o ATP, ácido úrico e componentes mitocondiais (DNA e formil-peptídeos) (CHEN & NUÑES, 2010).

Esse reconhecimento inicial de PAMPs e DAMPs leva à produção de vários mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, aminas vasoativas, quimiocinas e eicosanoides. Como consequência, há formação de exsudato inflamatório local composto por proteínas plasmáticas e leucócitos, principalmente neutrófilos (MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores inflamatórios promovem vasodilatação e consequente redução na velocidade do fluxo sanguíneo que resulta no deslocamento dos neutrófilos para a

periferia dos vasos, fenômeno denominado marginação. Após a marginação, há o rolamento dos neutrófilos, por meio da expressão de receptores na membrana das células endoteliais denominadas selectinas (ALVES-FILHO *et al.*, 2010).

Posterior ao rolamento, dá-se a adesão firme entre o endotélio e os leucócitos mediada por integrinas. Este último evento decorre da maior afinidade entre a alfa e β -integrinas dos leucócitos com seus respectivos ligantes no endotélio, tais como LFA-1 e VLA-4 pelos neutrófilos, que interagem com ICAM e VCAM das células endoteliais (ABBAS & LICHTMAN, 2005). Ocorrendo então a transmigração dos neutrófilos.

Após a saída dos vasos, os neutrófilos se dirigem para o foco infeccioso guiados por um gradiente quimiotático, o qual pode ser formado por quimiocinas, como leucotrieno B4 (LTB₄), C5a (anafilatoxina), IL-8 e componentes bacterianos como peptídeos formilados (JANETOPOULOS & FIRTEL, 2008).

Quando chegam no tecido lesado ou no foco da infecção, os neutrófilos se tornam ativados, ou pelo contato direto com o patógeno, ou pela ação das citocinas liberadas pelas células residentes. Na tentativa de matar os agentes invasores, o neutrófilo libera o conteúdo tóxico dos seus grânulos, o que inclui espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio e proteinases. Quando esses potentes efetores não discriminam entre marcadores microbianos e do hospedeiro, então os efeitos colaterais aos tecidos do hospedeiro são inevitáveis (MEDZHITOV, 2008).

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, bem como o peroxinitrito, participam dos mecanismos microbicidas dos neutrófilos (TSUKAHARA *et al.*, 2001). Sob condições patológicas, tais radicais são liberados no meio extracelular, onde são responsáveis pelo dano tecidual durante uma resposta inflamatória não controlada (NOVELLI, 1998).

No trato gastrointestinal, o processo inflamatório é um componente chave na defesa da mucosa. Uma resposta inflamatória adequada a agentes externos e internos evita o agravamento de lesões. Contudo, o comprometimento dessa resposta, ou o seu prolongamento, pode contribuir para complicar o quadro lesivo instalado e, conseqüentemente, os sintomas associados. Em geral, a resposta é coordenada pelos mediadores liberados por células epiteliais e da lâmina própria como, por exemplo, mastócitos, linfócitos, neurônios e fibroblastos (MATIN & WALLACE, 2006).

1.3.1 Falência da migração de neutrófilos em condições patológicas sistêmicas

Durante um processo infeccioso, os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao foco da infecção. Eles possuem um importante papel na defesa contra infecções bacterianas, incluindo a sepse, devido ao grande estoque de enzimas proteolíticas e a rápida produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio capazes de eliminar bactérias patogênicas (MEDZHITOV, 2000).

A sepse é um exemplo clássico de processo inflamatório sistêmico frente à infecção. Mais comumente, a sepse é causada por infecção bacteriana, embora vírus, parasitas e fungos também possam ser a causa (VINCENT *et al.*, 2006).

Uma resposta inflamatória controlada é benéfica (por exemplo, no fornecimento de proteção contra a infecção), mas pode tornar-se prejudicial quando é desregulada (por exemplo, causando choque séptico). Assim, o estado patológico inflamatório exige uma contrapartida fisiológica (MEDZHITOV, 2008).

Os diferentes sinais que caracterizam a sepse severa são consequências de uma reação inflamatória sistêmica exacerbada associada à ausência do controle eficaz da infecção inicial. Tal resposta inflamatória é caracterizada pela produção de grandes quantidades de mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, etc) produzidos em resposta a componentes microbianos (PAMPs) presentes na circulação (MEDZHITOV, 2012).

Apesar dos mecanismos envolvidos na falência da migração de neutrófilos durante a sepse não estarem completamente elucidados, vários trabalhos demonstram que a alta concentração sistêmica de citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-8, bem como de outros mediadores, como proteínas de fase aguda, mediadores gasosos, espécies reativas de oxigênio, entre outros, pode levar à redução da migração de neutrófilos para o foco infeccioso, pela redução da interação entre os neutrófilos e o endotélio (TAVARES-MURTA *et al.*, 1998; BENJAMIM *et al.*, 2000; BENJAMIM *et al.*, 2002; ALVES-FILHO *et al.*, 2005; ALVES-FILHO *et al.*, 2008). Além destes mecanismos, a ativação direta dos TLR promove redução na expressão de receptores quimiotáticos CXCR2 em neutrófilos, contribuindo para a inibição da migração de neutrófilos para o foco infeccioso durante a sepse (ALVES-FILHO *et al.*, 2009; ALVES-FILHO *et al.*, 2010).

A sinalização através de TLR2, TLR4 e TLR9 em neutrófilos e sua relação na diminuição de receptores quimiotáticos, já foi documentada na sepse. Os mecanismos responsáveis pela internalização de receptores quimiotáticos, como o CXCR2, por exemplo, envolvem a participação dos TLRs, o excesso de óxido nítrico, ativação de

guanilato ciclase e quinases de receptores ligados à proteína G (GRKs), além de níveis aumentados de TNF- α (SONEGO *et al.*, 2014).

Adicionalmente à expressão diminuída de CXCR2, SOUTO e colaboradores (2011) demonstraram, em modelo experimental de sepse grave, que os neutrófilos apresentam maior expressão do receptor CCR2, com migração para sítios não relacionados à infecção, como coração, pulmões e rins.

1.4 Quimiocinas

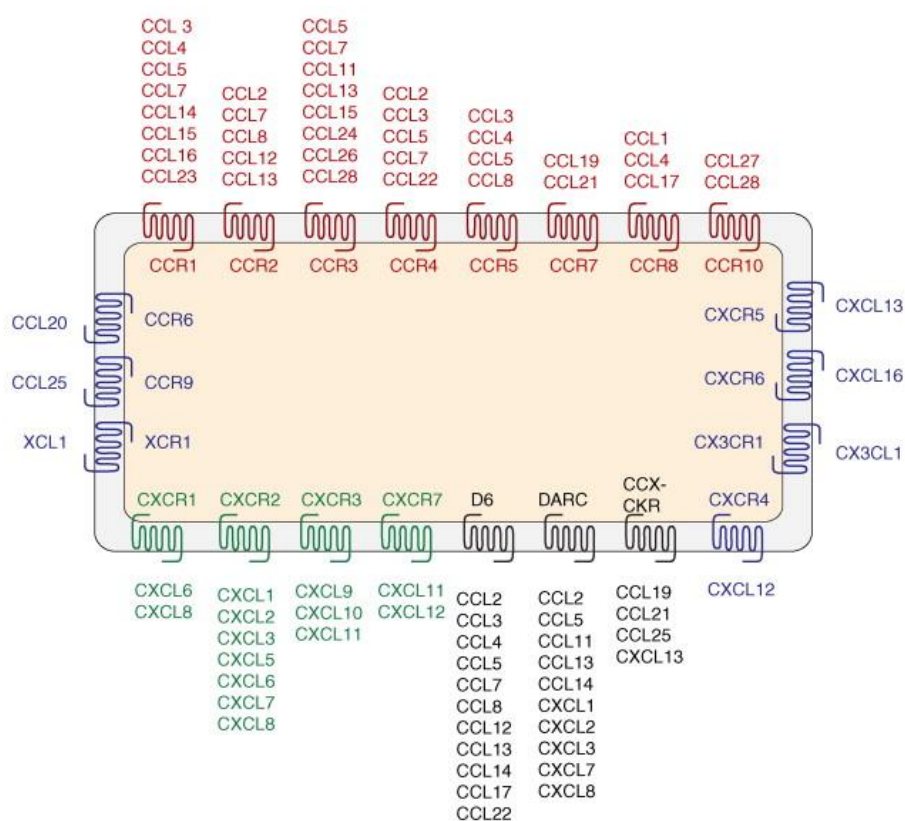
Quimiocinas são subgrupos de citocinas quimioatraentes que, dentre outras funções, regulam o tráfico de leucócitos (SANZ & KUBES, 2012). São pequenas proteínas homólogas (8-15 KDa) divididas em famílias com base na posição relativa de resíduos de cisteína na posição N-terminal da proteína. Tradicionalmente, quimiocinas e seus receptores estão divididos em quatro famílias: CXC, CC, C e CX₃C, onde C representa a cisteína e X/X₃ representa um ou três aminoácidos. As duas maiores famílias estruturais são distinguidas pelo arranjo de resíduos de cisteínas adjacentes (CC) ou separados por um aminoácido (CXC). Um pequeno número de quimiocinas possui uma única cisteína (família C) ou duas cisteínas separadas por três aminoácidos (CX₃C) (ABBAS & LICHTMAN, 2005).

A maioria das quimiocinas são classificadas como pró-inflamatórias, isso porque elas desempenham um papel central no recrutamento de neutrófilos durante o processo inflamatório. No entanto, pesquisas desde meados dos anos 1990, tem identificado uma gama de quimiocinas expressas de forma constitutiva. Em contraste com as quimiocinas inflamatórias, que atraem principalmente macrófagos ou neutrófilos, as constitutivas atuam como estímulos quimiotáticos para linfócitos ou células dendríticas (ZLOTNIK & YOSHIE, 2012).

Através da ativação de receptores acoplados à proteína G, as quimiocinas são capazes de controlar o tráfico de células através do endotélio vascular em condições fisiológicas e patológicas (KOELINK *et al.*, 2012). Em condições inflamatórias, elas atuam como mediadores pró-inflamatórios secundários que são, tipicamente, induzidos pelos mediadores pró-inflamatórios primários como a Interleucina-1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (GROVES & JIANG, 1995). Promovendo assim, a migração dessas células do sistema imune para sítios de inflamação (MOSER *et al.*, 2004).

Uma característica geral das quimiocinas é o seu grau de diversidade em termos de ligação a receptores: a maioria das quimiocinas pode interagir com mais de um receptor, sendo a recíproca verdadeira. Isso se aplica principalmente às quimiocinas inflamatórias, como CXCL8, CCL2 e CCL3, que são induzidas na vigência de um processo inflamatório, enquanto as quimiocinas homeostáticas, como CX3CL1 e CCL20, tem um papel de maior seletividade para receptores específicos, apresentando expressão constitutiva, regulando o tráfego celular em embriões e feto e a participação de leucócitos na imunovigilância (**Figura 3**) (COLOBRAN *et al.*, 2007).

Figura 3: Quimiocinas e seus respectivos receptores



TRENDS in Molecular Medicine

Existem mais de duas dezenas de tipos de receptores de quimiocinas, os quais sinalizam via proteína G e são classificados em quatro subfamílias de acordo com o número e espaçamento de resíduos de cisteína em CXCR, CCR, CR ou CX3CR. Dentre as subfamílias de quimiocinas ligantes destes receptores, incluem-se: CXC ou alfa quimiocinas, CC ou beta quimiocinas, C ou gama quimiocinas e CX3C ou delta quimiocinas. Fonte: Adaptado de LAZENNEC & RICHMOND, 2010.

As quimiocinas CXC são potentes quimiotáticos de neutrófilos, via receptores CXCR1 e CXCR2, além de terem efeito pró-angiogênico. CXCR1 e CXCR2 são os principais receptores quimiotáticos expressos na superfície dos neutrófilos e medeiam a

migração desses neutrófilos em direção às quimiocinas CXC (Revisto por MORTIER *et al.*, 2012).

Dada a importância do processo de migração de neutrófilos durante condições fisiopatológicas, como na mucosite intestinal induzida por quimioterápicos, por exemplo, o nosso grupo de pesquisa vem avaliando o papel das quimiocinas na evolução desse processo. Sendo o receptor CXCR2 o principal receptor quimiotático para os neutrófilos, interagindo com as quimiocinas CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC (murino) e CXCL8 (humanos), a modulação desse receptor foi o nosso objeto de estudo.

Estudos demonstram que as quimiocinas e seus respectivos receptores tem importante papel regulador em diversas doenças inflamatórias, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, artrite reumatoide, aterosclerose e doença inflamatória intestinal (MOSER *et al.*, 2004; KOELINK *et al.*, 2012). Na doença inflamatória intestinal (IBD), por exemplo, tem sido descrito um aumento da expressão de quimiocinas, como a proteína quimioatraente de monócitos CCL2, a proteína inflamatória de macrófagos CCL3 e Interleucina-8 (IL-8) (revisto por MAEDA *et al.*, 2011).

O receptor de quimiocina, CXCR2 e o seu ligante, CXCL8/IL-8 (análogo da KC em camundongos), estão expressos em diferentes tipos de cancer incluindo pulmão, cólon, ovário e próstata (ZHU, *et al.*, 2004). CXCL8 associado ao tumor promove aumento da invasividade, angiogênese e diminui a responsividade do tumor aos agentes anticâncer. Além de CXCL8, um outro ligante de CXCR2, o Gro α , aumenta significativamente, o poder invasivo de células cancerígenas (LUPPI *et al.*, 2007).

Uma vez que CXCL8/CXCR2 tem demonstrado um papel crítico na inflamação, o antagonismo de CXCR2 tem por objetivo regular as funções efetoras dos neutrófilos, com habilidade em modificar o recrutamento e a ativação destas células, prevenindo uma resposta inflamatória excessiva associada com dano tecidual mediado pela resposta neutrofílica intensa (PEASE *et al.*, 2002).

Com relação à mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, MELO e colaboradores (2008) demonstraram que KC (quimiocina murina análoga à IL-8 humana) desempenha papel relevante nessa afecção. Os autores mostraram que os níveis de KC elevaram-se em camundongos que receberam irinotecano, quando comparados aos que receberam apenas salina. Além disso, a modulação dessa quimiocina com a Pentoxifilina,

inibidor inespecífico de citocinas, significativamente reduziu as lesões intestinais induzidas pelo irinotecano, com diminuição da atividade da mieloperoxidase e do dano na arquitetura do epitélio intestinal. Também foi observada uma redução na severidade da diarreia induzida pelo irinotecano nos animais que receberam Pentoxifilina.

O SB225002 é um potente antagonista seletivo de receptor CXCR2. Foi constatado que o uso deste antagonista é potente o suficiente para inibir CXCR2 e inibir a quimiotaxia de neutrófilos induzida por IL-8 e GRO α . Dessa forma, SB225002 é uma ferramenta útil para definir o papel fisiopatológico de CXCR2 nos processos inflamatórios onde os neutrófilos parecem ter uma participação importante (WHITE *et al.*, 1998), como na mucosite intestinal.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Avaliar o papel dos receptores CXCR2 na patogênese da mucosite intestinal induzida por Irinotecano.

2.2 Específicos:

- Repadronizar o modelo experimental de mucosite induzida por irinotecano;
- Estudar o impacto do antagonismo de receptores CXCR2 sobre as alterações histopatológicas e morfométricas na mucosite intestinal;
- Investigar se a modulação de receptores CXCR2 interfere com curso da resposta inflamatória na mucosite;
- Determinar o efeito do irinotecano sobre a resposta quimiotática de neutrófilos;
- Avaliar a expressão de receptores CXCR2 e CCR2 em neutrófilos durante a mucosite
- Correlacionar o estabelecimento da mucosite e o bloqueio de receptores CXCR2 com a translocação bacteriana.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos pesando entre 18 e 25 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, medindo 40 centímetros (cm) de comprimento, 31 cm de largura e 17 cm de altura, forradas com raspa de madeira, trocadas duas vezes por semana. Permaneceram em um ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C, com exaustão de ar, ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). A pesquisa foi previamente submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e aprovado de acordo com o protocolo CEPA nº 58/14

3.3 EQUIPAMENTOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

- Agitador Vortex – Cetomart MV
- Autoclave
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AI200
- Banho-Maria BM100, Fanem
- Câmera de contagem Neubauer
- Câmara de Boyden
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- Contador Automático de Células – Colter
- Citômetro de fluxo – FACSAria™
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas - ELISA ELX800, Biotek
- Espectrofotômetro UV-VIS,

- Estufa Incubadora de CO₂
- Freezer -80°C, Thermo Scientific
- Fluxo Laminar
- Lâmina lisa para microscopia 26 x 76 mm
- Lamínula 24 x 32 mm
- Material cirúrgico
- Medidor de pH, Hanna Instruments HI 8519N
- Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000 µL
- Micropipeta Multicanal Gilson 200 µL
- Pipetas sorológicas de 1, 5 e 10 mL
- Placa estéril de 96 poços
- Placa de petri
- Triturador (Pollytron)
- Tubos de Falcon 15 e 50 mL
- Tubos FACS

3.4 DROGAS, SOLUÇÕES E CORANTES

3.4.1 DROGAS

- Cloridrato de Irinotecano (Evoterin®, ampolas 5mL, 100mg/mL, Evolabis)
- SB225002 [N-(2-bromofenil)-N'-(2-hidroxi-4-nitrofelil)-ureia] obtido da Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom, foi dissolvido em DMSO, aliqotado e armazenado em - 20 °C por quatro dias (tempo necessário para a execução do protocolo experimental).
- Cloridrato de Xilazina 2% (Frasco ampola 10mL, Kensol®)
- Cloridrato de Quetamina 10% (Frasco ampola 10mL, Kensol®)

3.4.2 SOLUÇÕES

- Água destilada

- Água Mili-Q
- Albumina sérica bovina (BSA)
- Álcool 70%
- Dimetil Sulfoxido (DMSO) a 100% e a 2% (Merck)
- Hanks
- Heparina
- Meio Agar BHI
- Metanol
- Paraformaldeído 4% (PFA)
- Peróxido de Hidrogênio 30% (Sigma)
- Percoll 72 e 65% (Percoll, Fiuka Biochemica, Sigma-Aldrich®)
- RPMI-1640 medium, Sigma-Culture®, St. Louis, USA
- Salina tamponada com fosfato (PBS)
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%)
- Tampão fosfato de potássio

3.4.3 CORANTES

- Azul de tripan 0,04%, (Sigma)
- Hematoxilina (Merck)
- Eosina (Merck)

3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL

O protocolo experimental de indução de mucosite do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Câncer (LAFICA/UFC), é baseado no protocolo desenvolvido por IKUNO *et al.*, (1995) e adaptado por MELO *et al.*, (2008) e LIMA-JÚNIOR *et al.*, (2008) para as condições experimentais do laboratório. A dose de 75 mg/kg de irinotecano, administrada durante 4 dias, é a dose padronizada para o estudo dos efeitos deste quimioterápico na mucosa intestinal.

No entanto, para as novas condições experimentais do Laboratório de Inflamação e Dor (LID) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), onde os experimentos ocorreram, a dose de 75 mg/kg de irinotecano não foi suficiente para reproduzir o processo inflamatório esperado. Assim, fez-se necessário a execução de uma curva dose-resposta.

Além da dose, já padronizada, de 75 mg/kg de Irinotecano (IRINOTECANO, Evoterin[®] - Evolabis), foram utilizadas outras três diferentes doses ao longo da execução do nosso protocolo experimental, 90, 105 e 120 mg/kg de irinotecano. Como controle negativo utilizou-se solução salina (5 mL/kg). A eutanásia dos animais aconteceu no 7º dia após a primeira administração do quimioterápico (**Figura 4**). O dia 01 experimental correspondeu à injeção da primeira dose de irinotecano.

a) Grupos experimentais: curva dose- resposta

Os animais C57BL/6 foram divididos em grupos (n=6).

Grupo I: controle negativo injetado com salina (NaCl 0,9%, i.p.);

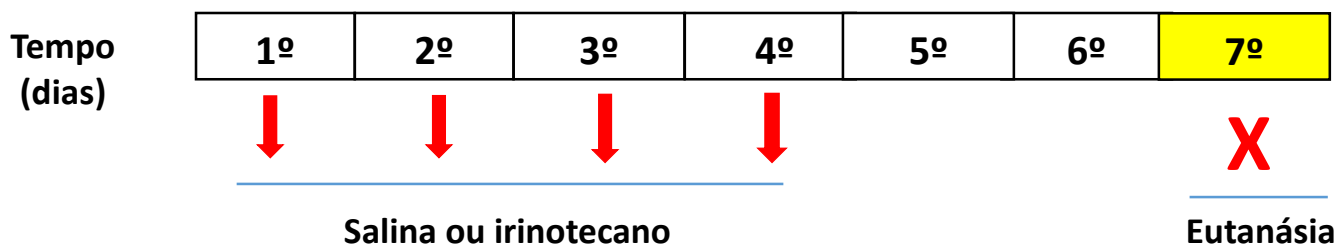
Grupo II: animais injetados com IRINOTECANO (75 mg/kg, i.p.);

Grupo III: animais injetados com IRINOTECANO (90 mg/kg, i.p.);

Grupo IV: animais injetados com IRINOTECANO (105 mg/kg, i.p.);

Grupo V: animais injetados com IRINOTECANO (120 mg/kg, i.p.).

Figura 4 – Grupos experimentais: curva dose- resposta



Camundongos C57BL/6 receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de salina (5 mL/kg) ou Irinotecano nas doses de 75, 90, 105 ou 120 mg/kg, uma injeção por dia e foram eutanasiados no 7º dia experimental (MELO *et al.*, 2008). X: eutanásia.

3.5.2 MODULAÇÃO DE RECEPTORES CXCR2 COM O ANTAGONISTA SB225002

Para a realização desse protocolo experimental, testou-se o efeito do SB225002 (0,3 mg/kg), um antagonista de receptores CXCR2, sobre a mucosite intestinal induzida por irinotecano (conforme **figura 5**).

a) Grupos experimentais – uso do antagonista de CXCR2, o SB225002

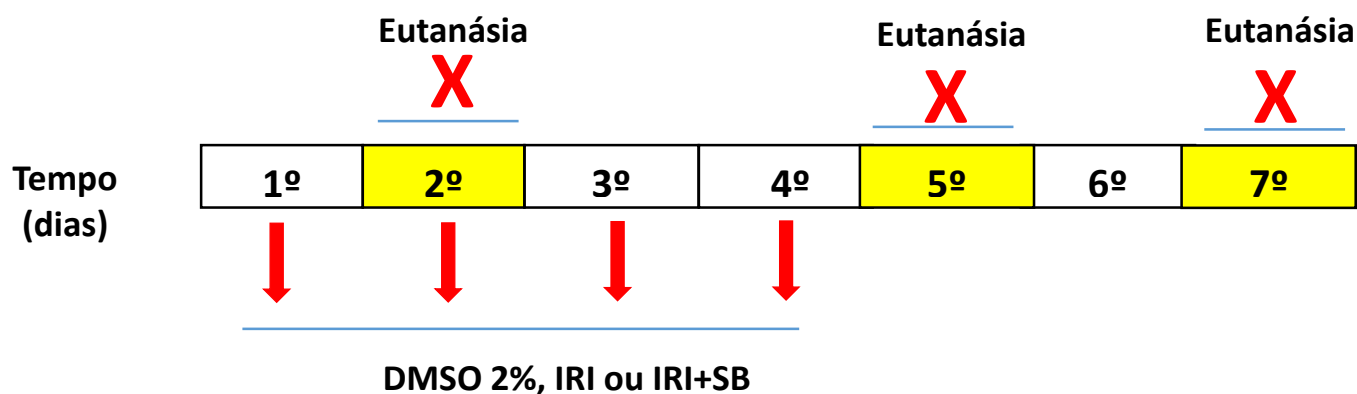
Os animais C57BL/6 foram divididos em grupos (n=5).

Grupo I: controle negativo injetado com Veículo (DMSO 2%, i.p.);

Grupo II: animais injetados com IRINOTECANO (120 mg/kg, i.p.);

Grupo III: animais injetados com IRINOTECANO (120 mg/kg, i.p.) + SB225002 (0,3 mg/kg).

Figura 5 – Grupos experimentais: uso do SB225002



Camundongos C57BL/6 receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de veículo (DMSO 2%), Irinotecano (120 mg/kg) ou irinotecano (120 mg/kg) + SB225002 (0,3mg/kg), uma injeção por dia e foram eutanasiados em três tempos diferentes, 24, 96 ou 144h (chamados, respectivamente de D2, D5 e D7), após a primeira administração do irinotecano. O SB foi administrado 1h antes do IRI. X: eutanásia.

3.5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DA INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO

a) Avaliação Ponderal

Os animais foram pesados diariamente. A massa corpórea foi medida em gramas (g) desde o primeiro dia experimental, ou seja, desde o início da indução da mucosite, até o dia da eutanásia. Os valores encontrados foram expressos em % de variação de massa corpórea, em relação à massa inicial e plotados em uma curva ponderal.

b) Avaliação dos escores de diarreia

Os eventos de diarreia apresentados após o início da indução da mucosite com irinotecano foram avaliados diariamente utilizando-se escores (propostos por KURITA *et al.*, 2000), como mostrados a seguir (**Quadro 1**):

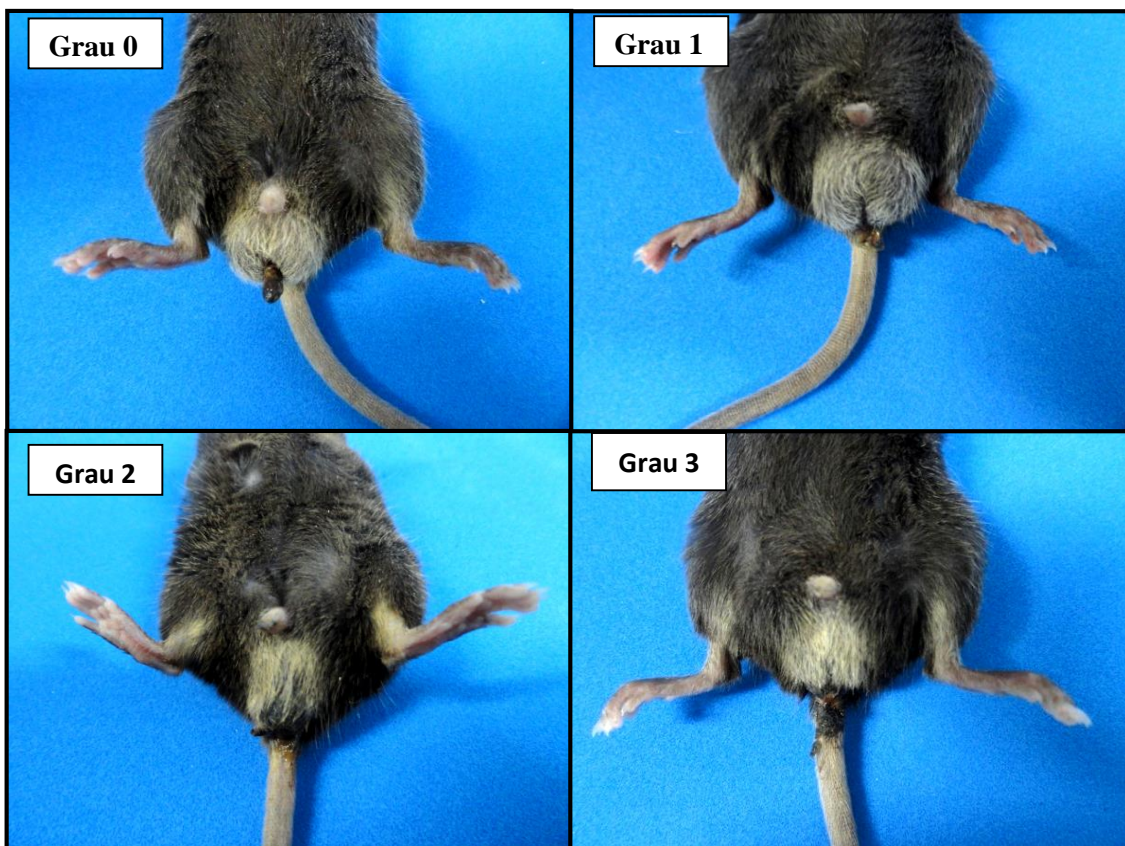
Quadro 1 – Escores de avaliação da diarreia em camundongos

Escore	Avaliação da diarreia
Escore 0	Fezes com aspecto normal
Escore 1	Fezes levemente alteradas, pouco umedecidas.
Escore 2	Fezes úmidas com pouca sujidade perianal
Escore 3	Fezes úmidas com bastante sujidade perianal.

Fonte: KURITA *et al.*, 2000

Esse parâmetro representa um indicativo de indução da mucosite, tendo em vista a associação do sinal diarreia à mucosite, observada na prática clínica (**Figura 6**).

Figura 6- Avaliação dos escores de diarreia pós-injeção do Irinotecano em camundongos C57BL/6



A avaliação da diarreia foi realizada através de escores atribuídos de acordo com a intensidade. **Grau 0:** fezes com aspecto normal; **Grau 1:** fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; **Grau 2:** fezes úmidas com pouca sujidade perianal; **Grau 3:** fezes úmidas com bastante sujidade perianal.

c) Histopatologia e Morfometria do Intestino Delgado (segmentos do íleo)

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, foi removido um segmento de aproximadamente 1 cm do íleo do camundongo. Em seguida, os tecidos foram fixados em paraformaldeído 4% (PFA), desidratados em gradientes de etanol, incluídos em blocos de parafina e corados pelo método H&E (Hematoxilina-Eosina).

A análise histopatológica do intestino delgado envolveu a observação do aspecto das vilosidades e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório (microscopia óptica 200x).

Para análise morfométrica, objetivou-se obter a medida das vilosidades, considerada desde o ponto de encontro entre duas vilosidades até o topo de cada uma (altura da vilosidade), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre duas vilosidades medidas até o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade absorptiva (razão entre altura das vilosidades/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento das vilosidades intestinais e as criptas de Lieberkühn foram calculadas em um utilizando-se o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilosidades e criptas por corte histopatológico, em microscopia óptica 100x e 200x (Microscópio Nikon com objetiva 10x ou 20x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x ou 20x).

d) Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, sua presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de placas.

Uma porção de intestino foi coletada e incubada em 200µL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “*pellet*” foi ressuspenso em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante do intestino foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M.

Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1x 10⁵ neutrófilos/ poço/ 50 µL). Determinou-se a absorbância em leitor de placas no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

e) Contagem de Leucócitos totais

Os animais foram anestesiados com xilazina (15mg/kg) + quetamina (100mg/kg) para coleta de sangue do plexo retro-orbital, e em seguida, realizou-se a contagem de leucócitos totais no contador automático de células - Colter. Os resultados foram expressos como número de células $\times 10^3/\mu\text{L}$. Adicionalmente, a contagem do número total de leucócitos foi realizada em todos os experimentos com o auxílio da câmera de Neubauer. Essa observação serviu para verificar a indução da leucopenia nos animais injetados com o irinotecano.

3.5.4 MENSURAÇÃO DO TAMANHO DO INTESTINO DELGADO E PESO DO LAVADO DO CONTEUDO INTESTINAL

a) Comprimento do intestino delgado

Após a eutanásia dos animais, nos três tempos analisados, 24h (D2), 96h (D5) e 144h (D7), realizou-se a medida do comprimento do intestino delgado (cm). Este parâmetro é importante na avaliação da mucosite intestinal, uma vez que o encurtamento do intestino delgado está diretamente relacionado ao agravamento do processo inflamatório. A medida do intestino foi determinada a partir do esfíncter pilórico até o esfíncter ileocecal.

b) Peso do lavado do conteúdo intestinal (intestino delgado)

Após a eutanásia dos animais, nos três tempos analisados, 24h (D2), 96h (D5) e 144h (D7), foram feitas incisões nas extremidades do intestino delgado. Um corte no começo do duodeno (próximo ao estômago) e outro no final do íleo (próximo ao ceco).

Todo o conteúdo intestinal foi lavado em placa de petri com um volume fixo de 10 ml de salina (0,9%). Em seguida, esse lavado foi transferido para tubos falcon de 15 ml, centrifugados e o sobrenadante foi descartado. O pellet, resíduo correspondente às fezes dos animais, foi pesado.

3.5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS KC, IL1- β E IFN- γ NA MUCOSA INTESTINAL

As concentrações de KC, IL1- β e IFN- γ foram mensuradas no intestino de animais usando método imunoenzimático (ELISA). Segmentos do intestino foram estocados em

tampão para citocinas contendo antiproteases em freezer -80°C . Os tecidos foram descongelados, triturados e homogeneizados com PBS, contendo antiproteases. O homogenato foi centrifugado por 10 min em 3000g e o sobrenadante imediatamente usado pelo ensaio de ELISA com anticorpos específicos para as citocinas estudadas. Brevemente, as placas de microtitulação (96 poços) foram preenchidas com 50 μl /poço com anticorpo específico anti-IL-1 β (R&D Systems), anti-KC (BD Biosciences) e anti-IFN- γ (R&D Systems) 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 temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva-padrão) contendo as concentrações adequadas de IL-1 β (4000 pg/ml), KC (4000 pg/ml) e IFN- γ (4000 pg/ml) foram adicionadas às placas (50 μl) e incubados overnight a 4°C . Após esse período, as placas foram novamente lavadas com PBS/Tween e 50 μl dos anticorpos biotinizados específicos para cada citocina foram adicionados 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 seguido da incorporação de solução de parada (ácido sulfúrico 2N). A concentração das citocinas foi expressa em pg/mL (SOUZA *et al.*, 2001).

3.5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES CCR2 E CXCR2 POR CITOMETRIA DE FLUXO

Todas as amostras foram adquiridas em FACS AriaTM (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, USA), permitindo analisar as populações de neutrófilos (50.000 eventos/amostra) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho e complexidade ou fluorescência e individualizados por janelas (ou “Gates”).

A mediana da intensidade de fluorescência (MIF) para CXCR2 e CCR2 foram obtidas de populações Ly6G⁺ e anti-Gr1^{high}, respectivamente. As análises foram realizadas seguindo o mesmo padrão. Inicialmente, em tubo contendo células não marcadas optou-se por um gráfico de pontos (“Dot Plot”) cruzando as variáveis área (FSC-A) e altura das células (FSC-H) para definir uma população que exclui debris

celulares e grumos de células adquiridas como único evento. Após definir a primeira população, dentro desta, optou-se por um gráfico de pontos (“Dot Plot”) cruzando as variáveis: tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A), onde foi estabelecida população característica de neutrófilos. Depois de definidas, a primeira e segunda população foram “extendidas” para todos os tubos. Nos tubos contendo anticorpos marcados com fluorocromos, dentro da segunda população e com base no isotipo controle, utilizando gráficos de pontos (“Dot Plot”) cruzando as variáveis tamanho (FSC-A) e fluorescência, determinou-se a população marcada, bem como a mediana e a média de intensidade de fluorescência do alvo na dada população.

As análises foram realizadas utilizando o software Flowjo 7.5.5 (Flow Cytometry analysis software, Tree Star Inc., San Carlos, CA, USA) os resultados foram expressos como média da intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias \pm EPM).

a. Expressão de CXCR2

Para verificar a expressão do receptor quimiotático CXCR2 utilizou-se anticorpos monoclonais anti-Ly6G e anti-CXCR2 conjugados com FITC (1:200; R&D Systems) e PE (1:50; R&D Systems), respectivamente. As amostras de sangue total dos camundongos foram incubadas durante 30 minutos a 4° C com os anticorpos. Após a incubação, as hemácias foram lisadas com tampão a base de cloreto de amônio. As amostras foram, em seguida, lavadas 2 vezes com 2 ml de PBS contendo 2% de soro fetal bovino, centrifugadas a 400g por 10 minutos e ressuspensas em solução de PFA em PBS. Após esses procedimentos, elas foram adquiridas em FACS Aria™ (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, USA). Assim, a expressão de CXCR2 foi verificada em neutrófilos Ly6G⁺ do sangue total.

b. Expressão de CCR2

Para correlacionar a expressão de dois receptores quimiotáticos de neutrófilos, CXCR2 e CCR2, amostras do sangue total de camundongos tratados com irinotecano foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-Gr1 (1:200), anti-CXCR2 (1:50) e anti-CCR2 (1:50), conjugados com PerCP, PE e FITC, respectivamente. As amostras do sangue total foram incubadas por 30 minutos a 4°C com os anticorpos. Após incubação utilizou-se um tampão a base de cloreto de amônio para lisar as hemácias, as amostras foram lavadas 2 vezes com 2 ml de PBS contendo 2 % de soro fetal bovino, centrifugadas

a 400 g por 10 minutos e ressuspensas em solução de PFA em PBS. Após esses procedimentos, elas foram adquiridas em FACSAria™ (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, USA).

3.5.7 ENSAIO DE QUIMIOTAXIA COM A CÂMARA DE BOYDEN

a) Isolamento de neutrófilos da medula óssea para o ensaio de quimiotaxia

Primeiramente, os neutrófilos da medula óssea foram obtidos por meio de separação em soluções gradiente de Percoll a 72 e 65% (Percoll, Fiuka Biochemica, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Sweden.), 2mL cada. Resumidamente, dois mililitros do lavado do canal medular (fêmur e tíbia) com meio Hank's foram colocados sobre a solução gradiente de Percoll e centrifugados a 1200g, em temperatura de 20°C, com 2m/s² de aceleração e desaceleração, durante 32 minutos. A camada de mononucleares, sobre a solução a 65%, foi descartada e a camada de polimorfonucleares, sobre a solução a 72% foi colocada em tubo plástico estéril de 15 mL. As hemácias contidas entre os polimorfonucleares foram lisadas com tampão de NH₄Cl 4% e as células lavadas com meio Hank's. O número de células após o isolamento foi obtido em contador automático.

b) Quimiotaxia de neutrófilos

A quimiotaxia foi realizada em câmara de 48 poços (Câmara de Boyden, Neuro Probe Inc., Cabin John, USA) com membrana de policarbonato (Filtro de policarbonato 5µm, Neuroprobe, Pleasanton, CA, USA.) conforme preconizado por Arraes *et al.*, (2006). Os neutrófilos isolados da medula óssea de camundongos (1x 10⁶ células/mL) foram adicionados à câmara superior. Como agente quimiotático de neutrófilos utilizou-se na câmara inferior a quimiocina CXCL2 (também chamada GRO2, MIP-2 ou CINC-2a, 30ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), a qual é ligante de CXCR2. Como controle negativo utilizou-se meio RPMI (RPMI-1640 medium, Sigma-Culture®, St. Louis, USA) acrescido de albumina sérica bovina 0,01% (BSA) em substituição à CXCL2. Após uma hora de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂, a membrana foi removida da câmara, lavada para a eliminação de células não aderidas, fixadas com metanol e coradas (Instant-prov, Newprov, Pinhais-PR, Brasil). Em seguida, os neutrófilos foram contados em microscópio óptico (aumento de 1000X com lente de

imersão em óleo) abrangendo aleatoriamente cinco campos por poço. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em número de neutrófilos/campo.

3.5.8 AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO

Para avaliar a bacteremia, os animais foram anestesiados com xilazina (15mg/kg) + quetamina (100mg/kg) e realizada a coleta do sangue do plexo retro-orbital, em condições estéreis. O sangue heparinizado (10 μ L) foi semeado em placas de Petri contendo meio ágar BHI. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h. Realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os resultados foram expressos como Log de UFC/mL do sangue periférico.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (Erro padrão da média), para as variáveis com distribuição normal contínuas ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal categóricas.

A análise estatística entre os grupos foi realizada empregando-se o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos (variáveis contínuas) e não-paramétricos (variáveis categóricas), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o Software GraphPad Prism[®], versão 5.0

4 RESULTADOS

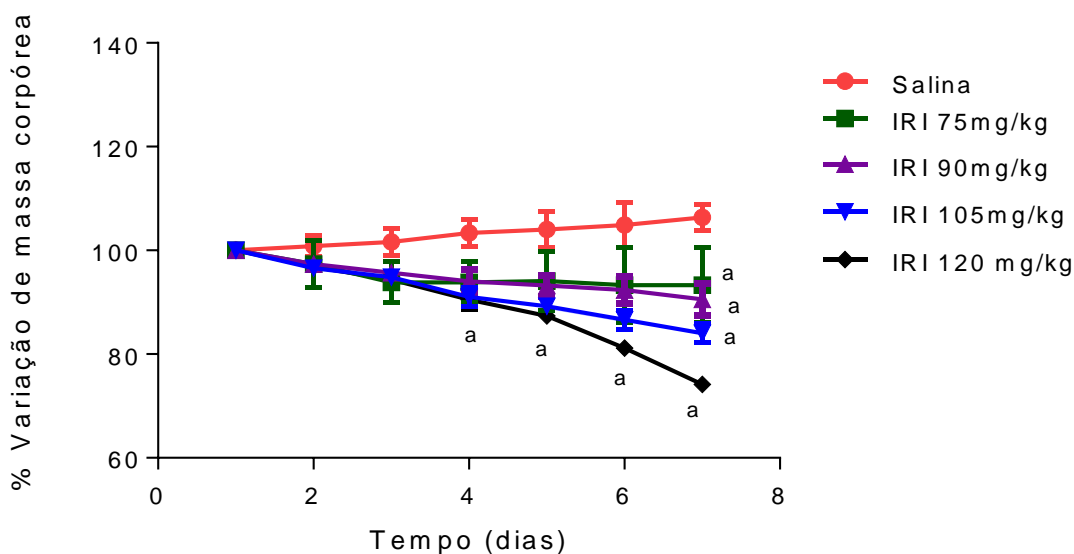
4.1 PADRONIZAÇÃO DA DOSE DE IRINOTECANO PARA INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL

Foram feitas administrações intraperitoneais de irinotecano nas doses de 75, 90, 105 e 120 mg/kg durante 4 dias. Os animais foram pesados diariamente a fim de se obter a curva ponderal. Além disso, ao longo do período de indução da mucosite, realizou-se a avaliação dos escores de diarreia. No sétimo dia após a primeira dose de irinotecano, realizou-se a contagem sanguínea de leucócitos a partir de amostras de sangue obtidas do plexo retro-orbital dos animais. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a análise dos parâmetros gerais da mucosite foi realizada, incluindo análise histopatológica e morfométrica intestinal (íleo) e dosagem de mieloperoxidase.

4.1.1 Avaliação Ponderal

Na **Figura 7** observa-se que o irinotecano, em todas as concentrações avaliadas, promoveu uma significativa ($P < 0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente quando comparado ao grupo controle injetado apenas com salina. A redução da massa corpórea foi observada a partir do quarto dia experimental, em todas as doses de irinotecano, e se manteve até o dia da eutanásia, o 7º dia experimental.

Figura 7 - Efeito da injeção de diferentes doses de irinotecano sobre a variação percentual de massa corpórea em função do tempo

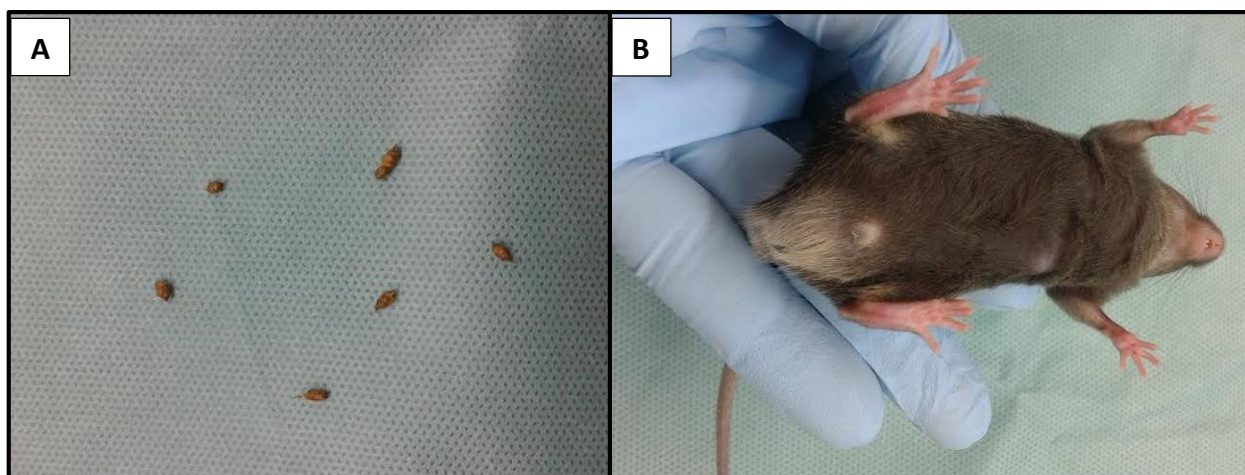


Os animais ($n=6$ /grupo) receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75, 90, 105 ou 120 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e foram pesados diariamente até o sétimo dia experimental. O estudo revela que animais injetados com irinotecano nas doses 75, 90, 105 ou 120 mg/kg apresentam perda ponderal significativa quando comparado aos animais que receberam apenas salina. Os pontos representam a média \pm E.P.M da variação percentual da massa corpórea comparado ao peso inicial. ^a $P < 0,05$ vs animal tratado com salina. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-Way ANOVA.

4.1.2 Avaliação dos escores de diarreia

A avaliação dos escores de diarreia foi feita diariamente até o 7º dia experimental, mas nenhum dos animais injetados com IRI (75, 90, 105 e 120 mg/kg), apresentou diarreia. Todos os camundongos tinham fezes sólidas e ressecadas ao longo das administrações do quimioterápico (**Figura 8A**) e não se observou sujidade perianal (**Figura 8B**).

Figura 8 – Efeito da injeção de diferentes doses de IRI sobre os escores de diarreia em camundongos C57BL/6

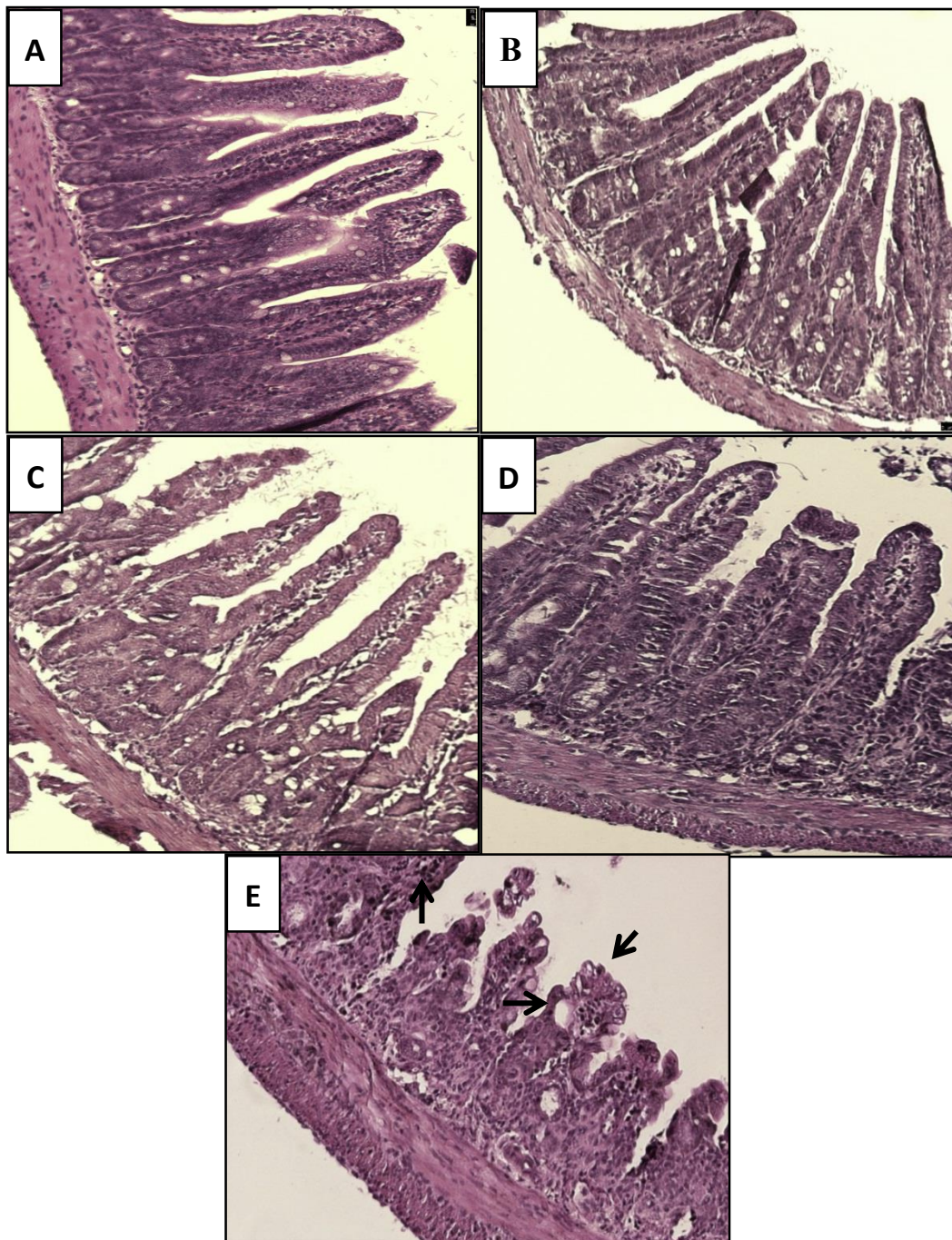


Os animais (n=6/grupo) receberam salina ou Irinotecano (75, 90, 105 e 120 mg/kg, i.p.), durante 4 dias e avaliados a diarreia até o sétimo dia experimental. A diarreia foi avaliada através de escores propostos por KURITA *et al.*, (2000). Em nenhuma das concentrações de IRI a diarreia foi observada. Os camundongos injetados com IRI apresentaram fezes sólidas e ressecadas (A) e nenhuma sujidade perianal (B).

4.1.3 Análises histopatológicas de segmentos de intestino delgado (íleo)

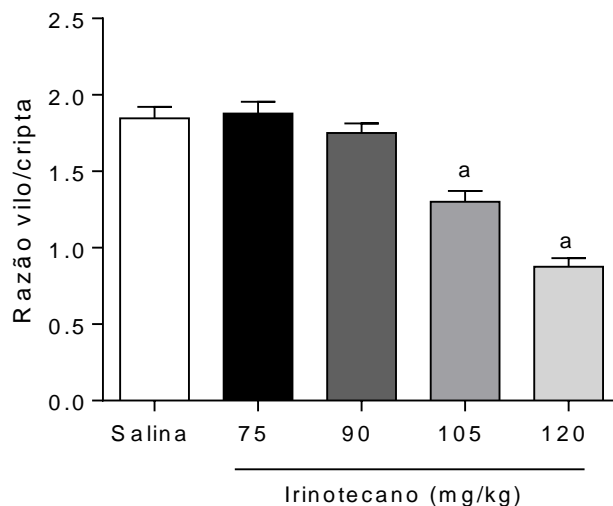
Após a eutanásia, as amostras de intestino foram utilizadas para análise histopatológica e morfométrica. As fotomicrografias do íleo de animais que receberam irinotecano nas doses de 75 (**Figura 9B**), 90 (**Figura 9C**), 105 (**Figura 9D**) e 120 (**Figura 9E**) mg/kg ilustram a extensão do dano histopatológico (aplanamento das vilosidades, necrose de criptas e intenso infiltrado polimorfonuclear) observado no grupo que recebeu a maior dose do quimioterápico quando comparado ao grupo salina (**Figura 9A**). Tais achados foram corroborados pela análise morfométrica, quando se observa que o irinotecano nas doses de 75 e 90 mg/kg não promoveu uma marcante redução ($P>0,05$) da razão vilo/cripta nos segmentos intestinais avaliados, quando comparado ao grupo salina. Entretanto, o quimioterápico nas doses de 105 e 120 mg/kg significativamente ($P<0,05$) reduziu a razão vilo/cripta nos segmentos intestinais analisados, quando comparado ao grupo salina, conforme ilustrado na **Figura 10**.

Figura 9 – Fotomicrografias de amostras de íleo após a injeção de diferentes doses de irinotecano em camundongos C57BL/6



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75, 90, 105 ou 120 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmento de íleo foi removido e corado pelo método de H&E para posterior análise histopatológica. A figura ilustra fotomicrografias representativas de íleo de camundongos C57BL/6 injetados com irinotecano ou com salina. Na mucosa dos animais que receberam IRI (120 mg/kg), os vilos estão encurtados (seta preta diagonal) e com vacuolizações de enterócitos (seta preta horizontal), além de infiltração de neutrófilos (seta preta vertical). **Painel A:** Salina; **Painel B:** IRI 75 mg/kg; **Painel C:** IRI 90 mg/kg; **Painel D:** IRI 105 mg/kg; **Painel E:** IRI 120 mg/kg; Aumento de 200x.

Figura 10 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica em segmentos intestinais (íleo)



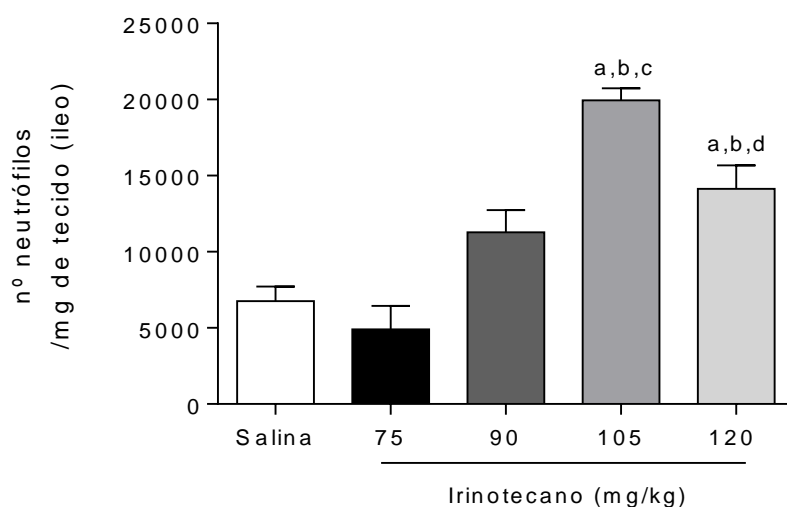
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p) ou irinotecano (75, 90, 105 ou 120 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfométrica (aumento 400x). Observa-se que o IRI não induz redução da razão vilo/cripta nas concentrações de 75 e 90 mg/kg quando comparada com camundongos injetados com salina. As concentrações de 105 e 120 mg/kg de irinotecano foram capazes de reduzir significativamente a razão vilo/cripta em comparação com o grupo que recebeu salina. Os valores representam a média ± EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. ^a $P < 0,05$ vs grupo de animais que recebeu apenas salina.

4.1.4 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

Para a determinação do infiltrado neutrofílico, através da dosagem da atividade da Mieloperoxidase (MPO), segmentos do intestino delgado dos animais (íleo) foram removidos e congelados para posterior realização do ensaio. As análises foram realizadas com amostras obtidas no 7º dia, após a administração da primeira dose de irinotecano. Foram avaliadas quatro doses diferentes de IRI (75, 90, 105 e 120 mg/kg), de acordo com o protocolo experimental. Conforme evidenciado na **figura 11**, o tratamento de camundongos C57BL/6 com irinotecano, nas concentrações de 75 e 90 mg/kg, não foi capaz de aumentar o infiltrado de neutrófilos nos segmentos intestinais analisados, quando comparados ao grupo salina ($P > 0,05$). Entretanto, as concentrações de 105 e 120

mg/kg de irinotecano significativamente aumentaram os níveis de MPO ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo que recebeu apenas salina.

Figura 11 – Curva dose-resposta do IRI sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais (íleo) de camundongos C57BL/6

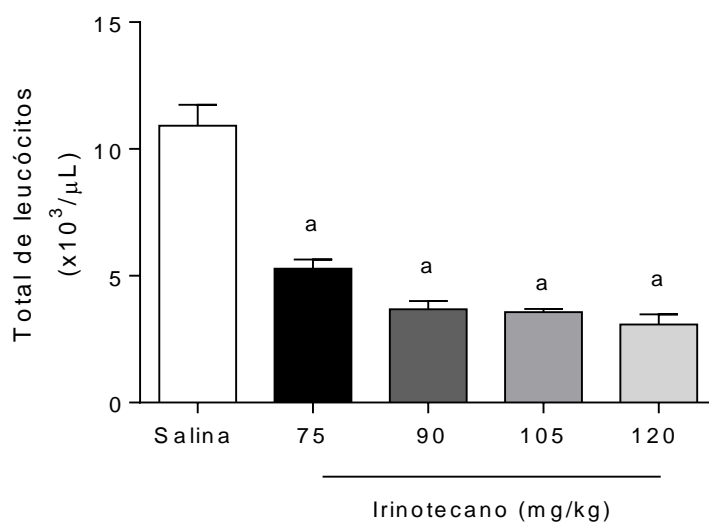


Os animais ($n=6$ /grupo) receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75, 90, 105 ou 120 mg/kg, i.p.) e foram eutanasiados no sétimo dia experimental. Amostras de íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado neutrofílico através da atividade da Mieloperoxidase (MPO). O gráfico ilustra que animais injetados com irinotecano nas doses de 75 ou 90 mg/kg não apresentaram diferença estatística quanto a atividade de MPO, nos segmentos intestinais, em comparação com o grupo salina. Entretanto, os grupos que receberam irinotecano nas doses de 105 ou 120 mg/kg apresentaram um significativo aumento no infiltrado neutrofílico no íleo quando comparados com o grupo salina. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de neutrófilos por mg de tecido. ^a $P < 0,05$ vs grupo tratado com salina; ^b $P < 0,05$ vs grupo com IRI 75 mg/kg; ^c $P < 0,05$ vs grupo com IRI 90 mg/kg; ^d $P < 0,05$ vs grupo com IRI 105 mg/kg. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.1.5 Contagem total de leucócitos

A **figura 12** evidencia a mielotoxicidade do irinotecano. Observa-se que o irinotecano em todas as doses testadas (75, 90, 105 e 120 mg/kg) induziu uma significativa ($P < 0,05$) leucopenia no sétimo dia quando comparado ao grupo salina.

Figura 12 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos totais em camundongos C57BL/6



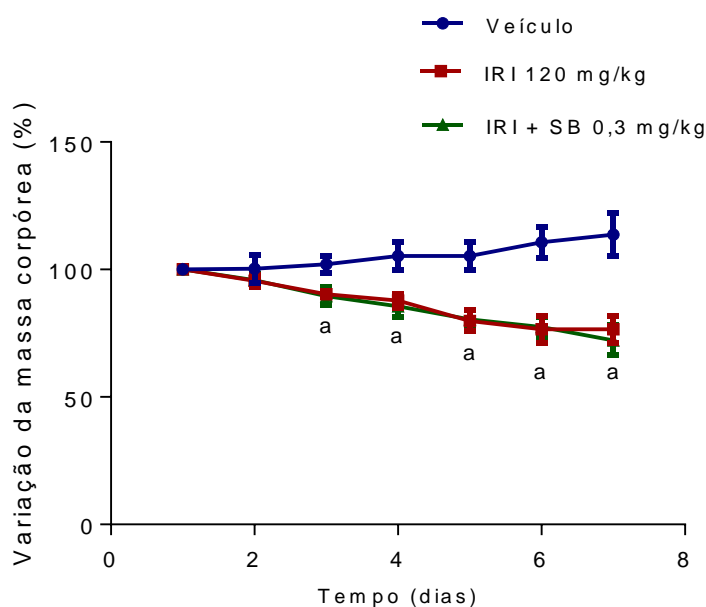
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75, 90, 105 ou 120 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital, e em seguida foi realizada a contagem do número total de leucócitos em contador automático de células - Colter. Observa-se o efeito do irinotecano em diminuir o número total de leucócitos circulantes em todas as concentrações estudadas. Os valores representam a média \pm E.P.M. do número de Leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$). ^a $P < 0,05$ vs animal tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.2 USO DO ANTAGONISTA DO RECEPTOR CXCR2, O SB225005, NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO

A **Figura 13** ilustra que tanto o grupo que recebeu apenas irinotecano como o grupo pré-tratado com o SB225002 (0,3 mg/kg) e injetado com irinotecano apresentaram

uma significativa ($P < 0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente quando comparado ao grupo controle tratado apenas com o veículo (DMSO 2%). A perda de massa corpórea começou a ser observada a partir do 3º dia e continuou decaindo até o 7º dia experimental.

Figura 13 - Efeito do tratamento com SB225002 sobre a variação da massa corpórea em função do tempo



Os animais foram pesados diariamente até o sétimo dia experimental. Observou-se que animais injetados apenas com o Irinotecano (120 mg/kg) ou em associação com o antagonista do CXCR2, o SB225002 (0,3mg/kg), apresentaram perda ponderal ($P < 0,05$), a partir do 3º dia experimental, quando comparados aos animais que receberam apenas o veículo. Os pontos representam a média \pm E.P.M da variação percentual da massa corpórea comparado ao peso inicial. Os dados foram analisados pelo teste Two-Way ANOVA/Tukey. ^a $P < 0,05$ vs grupo veículo.

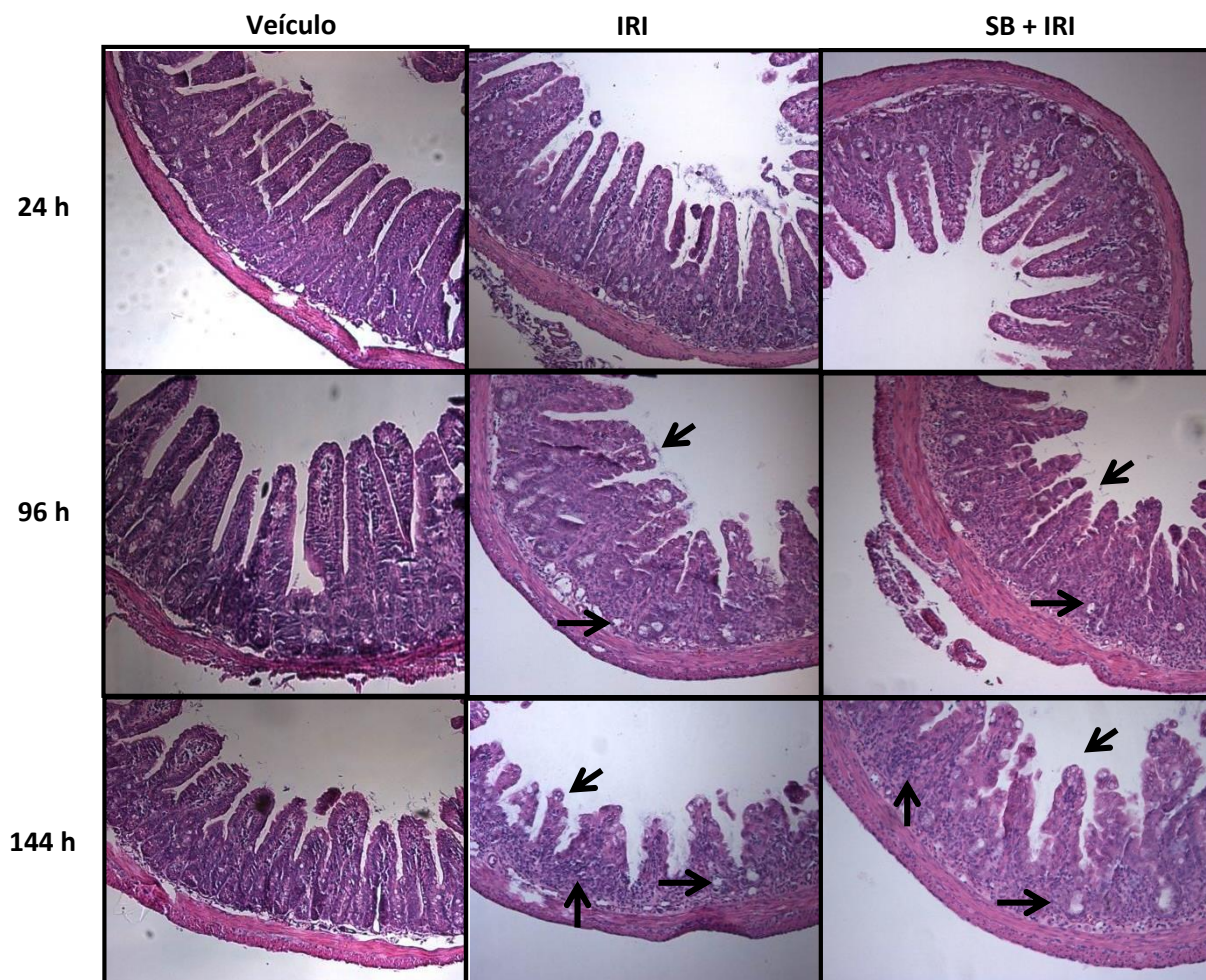
Após a eutanásia, as amostras de intestino foram utilizadas para análise histopatológica e morfométrica. As fotomicrografias do íleo de animais que receberam irinotecano ou SB225002 + Irinotecano ilustram pouca alteração histopatológica após 24 h da primeira dose das drogas (**Figura 14**) progredindo para um aumento na extensão do dano histopatológico caracterizado por achatamento das vilosidades, necrose de criptas e infiltrado polimorfonuclear observados no quinto (96 h) e no sétimo (144 h) dias experimentais (**Figura 14**). Tais achados foram corroborados pela análise morfométrica,

observando-se que o irinotecano (120 mg/kg) promoveu uma marcante redução de forma tempo dependente ($P < 0,05$) da razão vilo/cripta nos segmentos intestinais avaliados em comparação ao grupo veículo (**Figura 15A a C**). Adicionalmente, a alteração morfométrica (redução da razão vilo/cripta) foi intensificada quando do pré-tratamento dos animais com o antagonista dos receptores CXCR2 em comparação ao grupo injetado somente com IRI. (**Figura 15B e C**).

O comprimento do intestino delgado foi outro parâmetro utilizado indicativo de lesão tecidual. Após a eutanásia dos animais, foi feita a medida do comprimento do intestino delgado o que se apresentou significativamente encurtado ($P < 0,05$) no sétimo dia (144 h, **Figura 16C**). Entretanto, nos tempos de 24 h (**Figura 16A**) e 96 h (**Figura 16B**) não foram detectadas alterações nesse parâmetro entre os grupos tratados e o grupo veículo ($P > 0,05$).

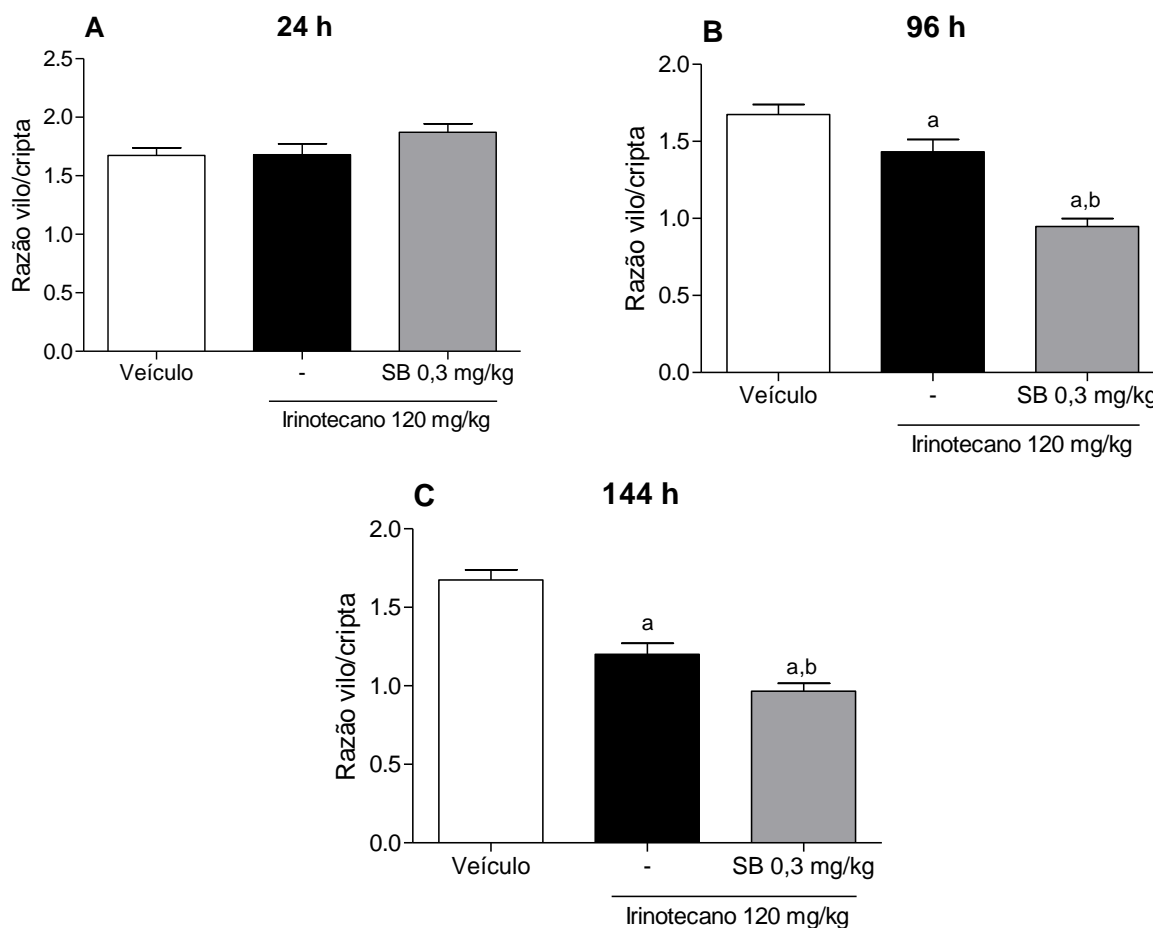
Nenhum dos animais dos grupos analisados, veículo (DMSO 2%), IRI (120 mg/kg) ou IRI+SB (0,3 mg/kg) apresentou diarreia. Ao longo da execução dos tratamentos, os animais apresentavam no intestino grosso fezes sólidas e ressecadas, o que se prolongou até o sétimo dia experimental. Assim sendo, utilizamos um novo parâmetro para analisar se o peso do conteúdo sólido do intestino delgado dos animais que recebiam irinotecano sofriam alterações em relação ao grupo que recebia apenas o veículo. Conforme observado na **figura 17**, a partir do D2 (24 h, painel A), há diminuição do peso do conteúdo sólido no intestino delgado em ambos os grupos, IRI e IRI + SB, quando comparados ao grupo veículo. A referida redução persistiu ao longo do protocolo experimental, como evidenciado no D5 (96 h, **Figura 17B**) e D7 (144 h, **Figura 17C**).

Figura 14 – Fotomicrografias de amostras de íleo após bloqueio de receptores CXCR2



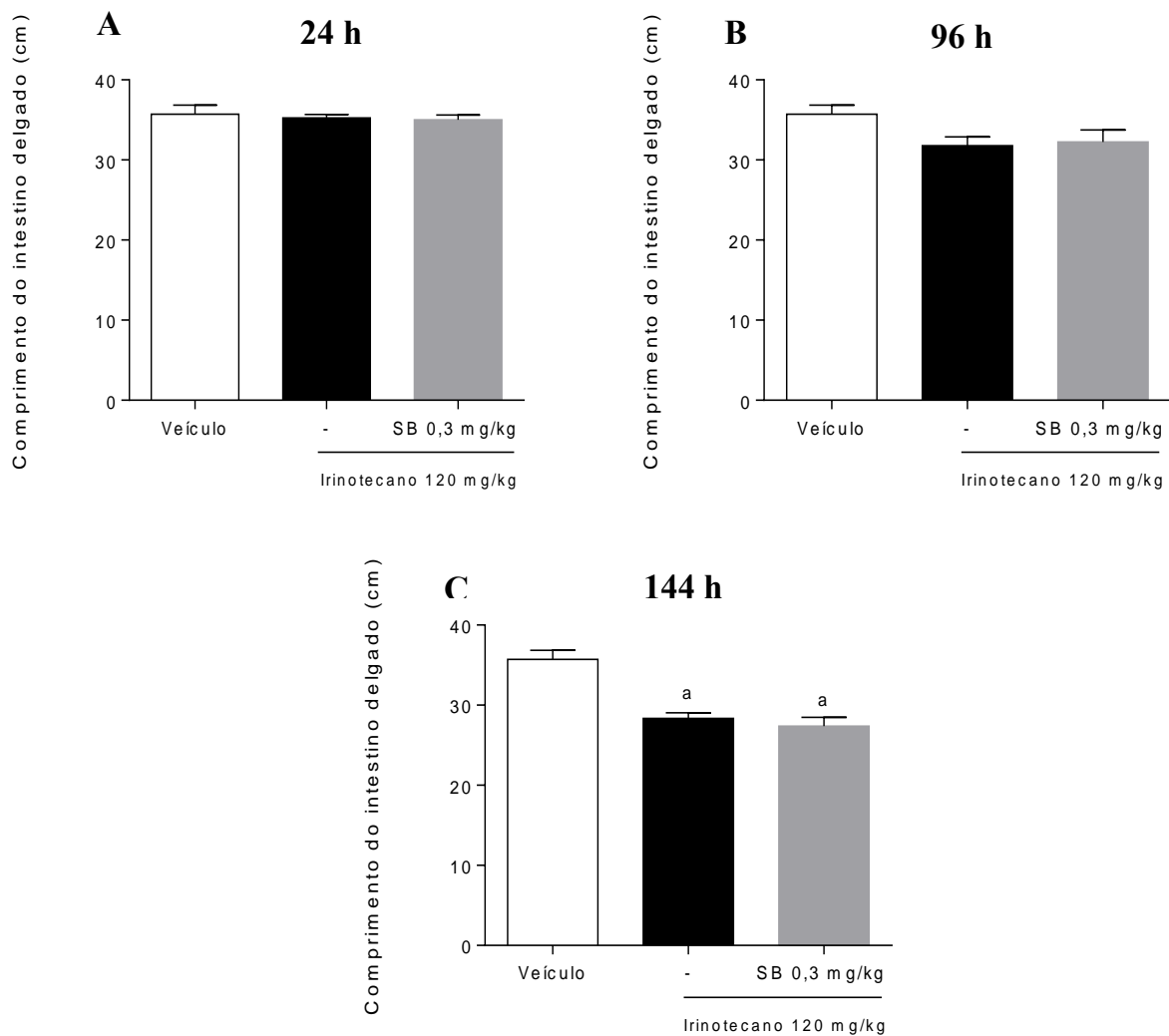
Os animais receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), irinotecano (IRI, 120 mg/kg, i.p.) ou SB225002 (0,3 mg/kg) + IRI por quatro dias consecutivos e foram sacrificados 24, 96 ou 144 h após a primeira dose do quimioterápico. Segmentos de íleo foram removidos e corados pelo método de H&E para posterior análise histopatológica. A figura ilustra fotomicrografias representativas de íleo de camundongos C57BL/6 sacrificados em diferentes tempos. Na mucosa dos animais que receberam IRI ou SB225002 + IRI, os vilos apresentam-se encurtados (seta preta diagonal) e com vacuolizações de enterócitos (seta preta horizontal), além de aumento da celularidade inflamatória (seta preta vertical). Aumento de 200x.

Figura 15 – Efeito do bloqueio de receptores CXCR2 sobre a razão vilo/cripta intestinal



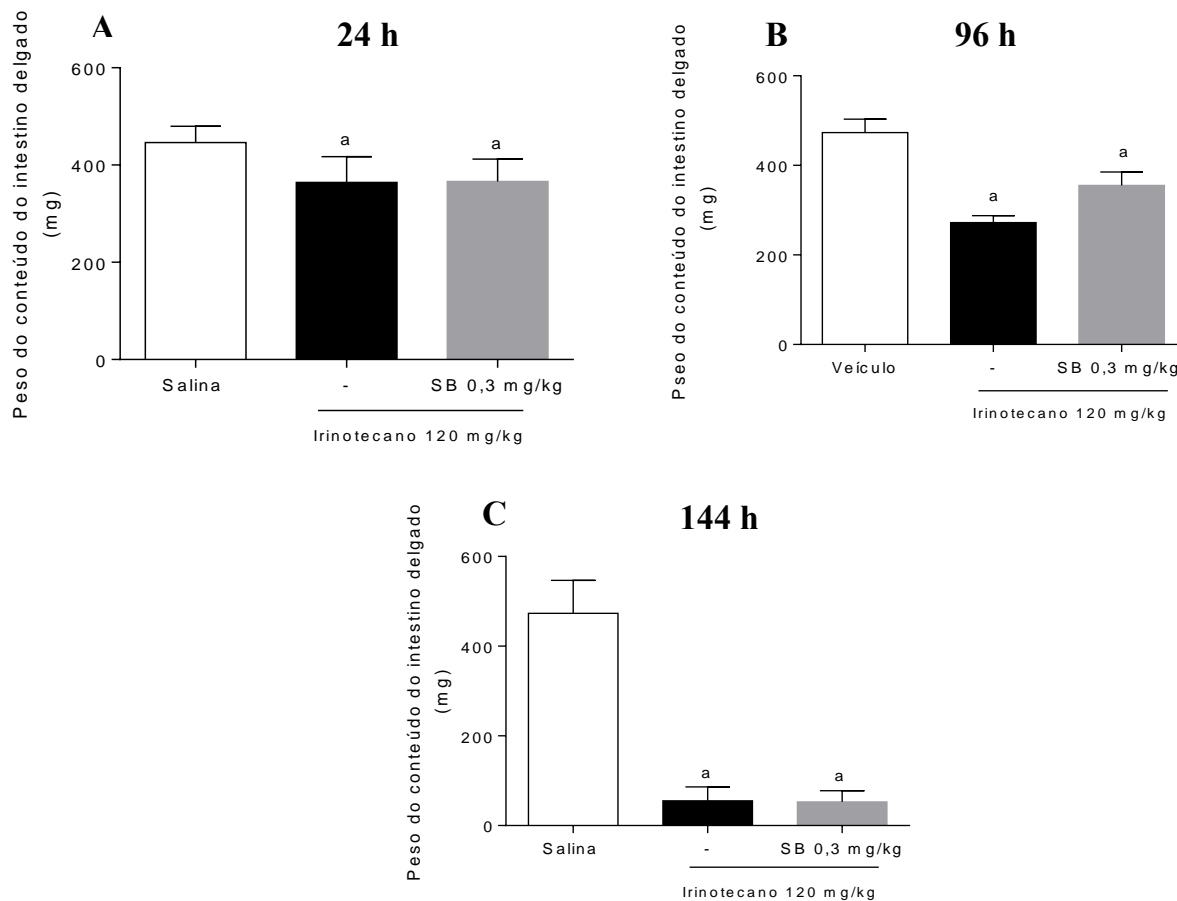
Os animais receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), irinotecano (IRI, 120 mg/kg, i.p.) ou SB225002 (antagonista de receptores CXCR2, 0,3 mg/kg) + IRI por quatro dias consecutivos e foram sacrificados 24, 96 ou 144 h após a primeira dose do quimioterápico. Segmentos de íleo foram removidos e corados pelo método de H&E para posterior análise morfológica. No tempo de 24 h (painel A) não se verificou diferença entre os grupos. Entretanto, observa-se que o IRI induz uma significativa redução tempo-dependente da razão vilo/cripta verificada de 96 h (**painel B**) e 144 h (**painel C**) quando comparada com camundongos injetados com veículo. As referidas alterações morfológicas foram intensificadas no grupo pré-tratado com o SB225002 versus o grupo IRI (**painéis B e C**). Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey. ^a $P < 0,05$ vs grupo de animais que recebeu apenas veículo; ^b $P < 0,05$ vs grupo IRI.

Figura 16 – Efeito do SB225002 sobre o comprimento do intestino delgado (cm) durante a mucosite intestinal



Os animais receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), irinotecano (120 mg/kg, i.p.) ou IRI + SB (0,3 mg/kg) e foram eutanasiados no D2 (**Painel A**), 24h após a primeira administração de IRI, D5 (96h, **Painel B**) e D7 (144 h, **Painel C**), quinto e sétimo dias experimentais, respectivamente. O comprimento total do intestino delgado foi medido (cm). Tanto o **painel A** quanto o **Painel B** mostram que nem o IRI sozinho nem a associação IRI+SB reduziram de forma significativa o comprimento do intestino delgado após o início do tratamento com o quimioterápico, em comparação ao grupo que recebeu apenas o veículo, DMSO 2%. O **Painel C** revela que ambos os grupos, quimioterápico sozinho ou em associação com o SB, significativamente reduziram o comprimento do intestino delgado quando comparados ao grupo veículo. Os valores representam a média \pm EPM do comprimento do intestino delgado. Painel C: ^a $P < 0,05$ vs grupo veículo. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Figura 17 – Efeito do bloqueio de receptores CXCR2 sobre o peso do conteúdo sólido no intestino delgado

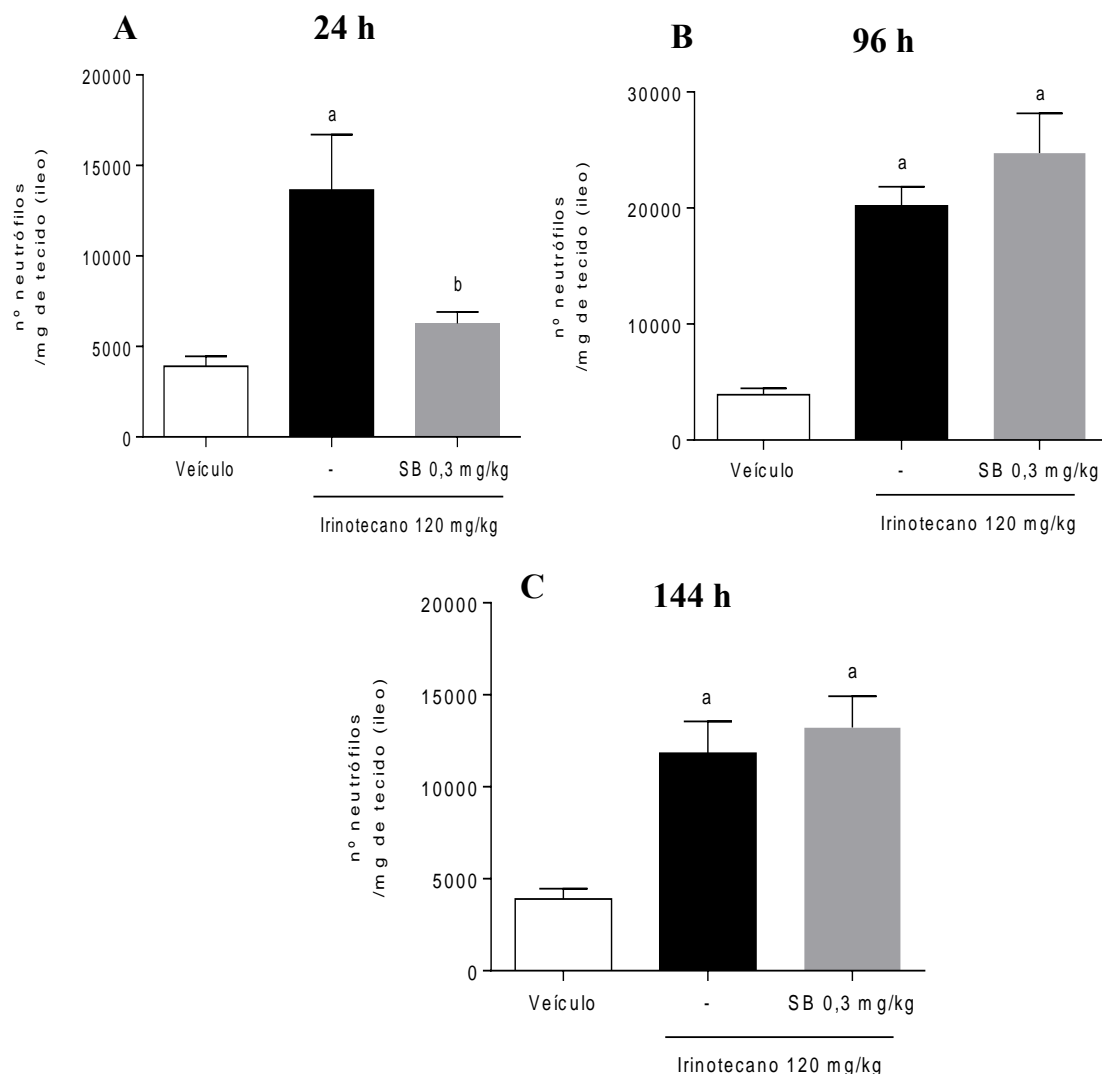


Os animais receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), irinotecano (120 mg/kg, i.p.) ou IRI + SB (0,3 mg/kg) e foram eutanasiados no D2 (**Painel A**), 24h após a primeira administração de IRI, D5 (**Painel B**) e D7 (**Painel C**), quinto e sétimo dias experimentais, respectivamente. Todo o intestino delgado foi lavado com 10 ml de salina em placas petri. O conteúdo foi transferido para tubos falcon e centrifugado. O sobrenadante obtido foi descartado e os pellets pesados. Em todos os tempos analisados, nos painéis A, B e C, os grupos irinotecano e IRI+SB significativamente reduziram o peso do conteúdo sólido no intestino delgado, quando comparados ao grupo veículo. Os valores representam a média \pm EPM do comprimento do intestino delgado. ^a $P < 0,05$ vs grupo veículo. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

Para a determinação do infiltrado neutrofílico através da dosagem da enzima Mieloperoxidase (MPO), análises foram realizadas com amostras obtidas em três tempos diferentes após a primeira dose do irinotecano, e apresentadas na **Figura 18** abaixo. O painel A mostra o número de neutrófilos por miligrama de tecido no tempo de 24h (D2), o painel B, 96h (D5), e o painel C, 144h (D7).

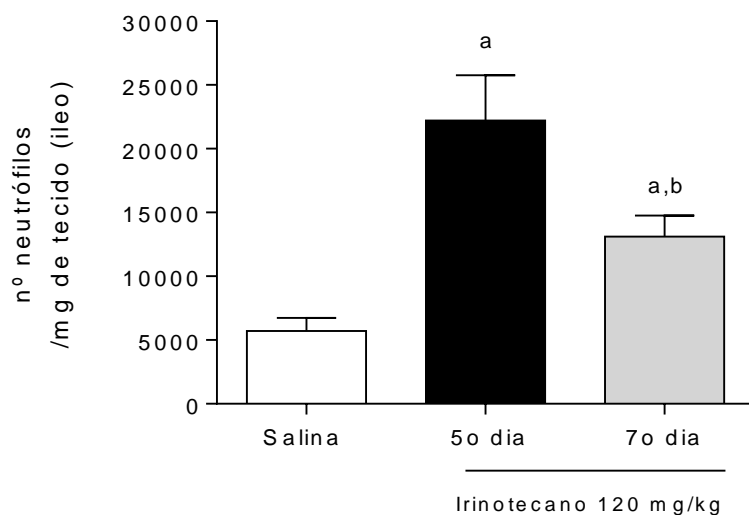
Conforme observado na **figura 18**, o irinotecano induziu um significativo aumento no número de neutrófilos no intestino quando comparado ao grupo veículo em todos os tempos analisados ($P < 0,05$, **Figura 18A-C**). Adicionalmente, no tempo de 24 h, o antagonismo sobre os receptores CXCR2 preveniu o acúmulo de neutrófilos ($P < 0,05$) quando comparados com o grupo que recebeu apenas irinotecano (**Figura 18A**). Entretanto, não houve proteção nos demais tempos ($P > 0,05$, **Figura 18B e C**) versus o grupo IRI. De forma interessante, conforme evidenciado na **figura 19**, observa-se que o infiltrado de neutrófilos no intestino de animais injetados com IRI (120 mg/kg), tem um pico no 5º dia experimental (96 h), decaindo significativamente no 7º dia (144 h, $P < 0,05$), mas ainda estatisticamente diferente em relação ao grupo que recebeu apenas veículo ($P < 0,05$).

Figura 18 - Efeito do SB225002 sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais (íleo)



Os animais receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), apenas o irinotecano (120 mg/kg, i.p.) ou IRI + SB (0,3 mg/kg) e foram eutanasiados no D2 (**Painel A**), 24h após a primeira administração de IRI, D5 (**Painel B**) e D7 (**Painel C**), quinto e sétimo dias experimentais, respectivamente. Amostras de íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado neutrofílico através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO). O **painel A** mostra que a associação IRI+SB significativamente reduziu o infiltrado neutrofílico em amostras de íleo, 24h após o início do tratamento com o quimioterápico, em comparação ao grupo que recebeu apenas o IRI. Tanto no **Painel B** quanto no **Painel C** observa-se que ambos os grupos, quimioterápico sozinho ou em associação com o SB, significativamente aumentaram os níveis de MPO quando comparados ao grupo veículo. Os valores representam a média \pm EPM do número de neutrófilos por mg de tecido. ^a $P < 0,05$ vs grupo veículo e ^b $P < 0,05$ vs grupo tratado apenas com o irinotecano. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

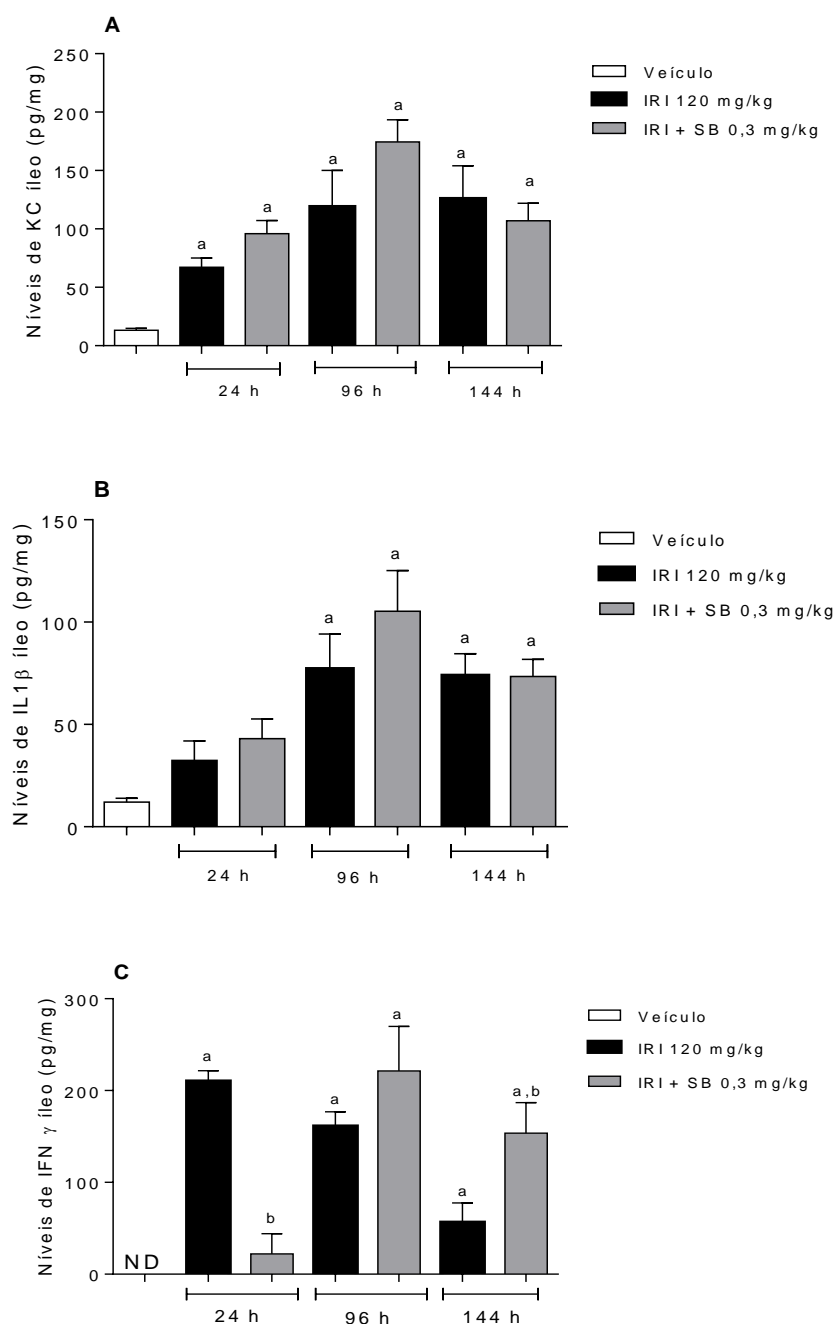
Figura 19 - Efeito do IRI em diferentes tempos sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais (íleo) de camundongos C57BL/6



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (120 mg/kg, i.p.) e foram eutanasiados no quinto ou sétimo dia experimental. Amostras de íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado neutrofilico através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO). O gráfico mostra que os animais que receberam IRI, significativamente aumentaram a atividade de MPO nos segmentos intestinais (íleo), no 5º e 7º dias experimentais, quando comparado com o grupo salina. Os valores representam a média \pm EPM do número de neutrófilos por mg de tecido. ^a $P < 0,05$ vs grupo tratado com salina; ^b $P < 0,05$ vs grupo com IRI 120 mg/kg eutanasiado no 5º dia. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

A **figura 20** ilustra o efeito do tratamento de animais com o irinotecano ou com a associação entre SB225002 e irinotecano sobre os níveis de citocinas (KC, IL-1 β e IFN- γ) em amostras de íleo dos camundongos C57BL/6. Na **Figura 20A**, dosagem de KC, observa-se um aumento significativo ($P<0,05$) dos níveis desta citocina nos grupos IRI (120 mg/kg) e IRI+SB (0,3 mg/kg) em todos os tempos avaliados, 24, 96 e 144 h, em comparação ao grupo veículo. No painel B da **Figura 20** observa-se o mesmo perfil para os níveis de IL-1 β , cujo aumento foi evidenciado somente nos tempos de 96 e 144 h, quando comparados ao grupo que recebeu apenas veículo ($P<0,05$). Em relação ao interferon- γ (IFN- γ), os níveis dessa citocina foram significativamente aumentados no grupo irinotecano no tempo de 24 h, seguido de um decaimento gradual até o tempo de 144h, verificando-se uma diferença estatística versus o grupo veículo ($P<0,05$, **Figura 20C**). Entretanto, o grupo pré-tratado com o antagonista de receptores CXCR2 apresentou níveis reduzidos dessa citocina em comparação ao grupo irinotecano no tempo de 24 h. Tais concentrações elevaram-se no tempo de 96 h, atingindo níveis idênticos aos do grupo irinotecano. No tempo de 144 h, a concentração tecidual de IFN- γ no grupo SB+IRI manteve-se elevada versus o grupo veículo ($P<0,05$, **Figura 20C**) e estatisticamente maior que no grupo irinotecano ($P<0,05$, **Figura 20C**).

Figura 20 – Efeito do tratamento com o SB225002 sobre os níveis de citocinas (KC, IL-1 β e IFN- γ) no íleo de camundongos C57BL/6



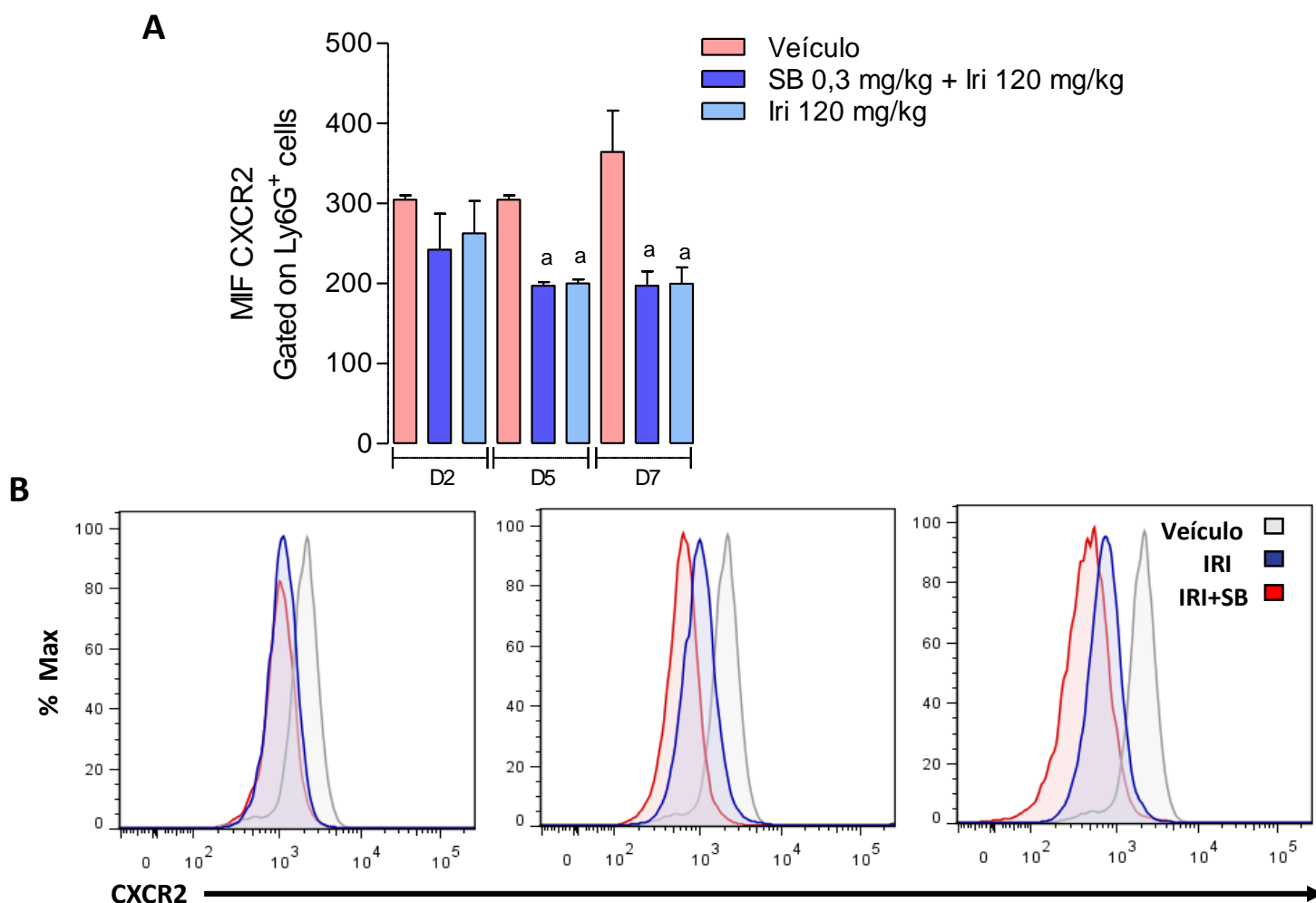
Os animais receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), irinotecano (120 mg/kg, i.p.) ou IRI + SB (0,3 mg/kg) e foram eutanasiados no D2, 24h após a primeira administração de IRI, D5 (96 h) ou D7 (144 h), quinto e sétimo dias experimentais, respectivamente. Amostras de íleo foram removidas e congeladas para posterior dosagem de citocinas KC (painel A), IL-1 β (Painel B) e INF- γ (Painel C). O ensaio foi realizado por ELISA. Os valores representam a média \pm EPM de pg/mg de tecido. ^a $P < 0,05$ vs grupo veículo; ^b $P < 0,05$ vs grupo Iri no mesmo tempo. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS RECEPTORES CXCR2 E CCR2 E ENSAIO DE QUIMIOTAXIA

4.3.1 O tratamento com irinotecano, sozinho ou associado ao SB225002, induz a internalização de CXCR2 em neutrófilos de forma tempo-dependente

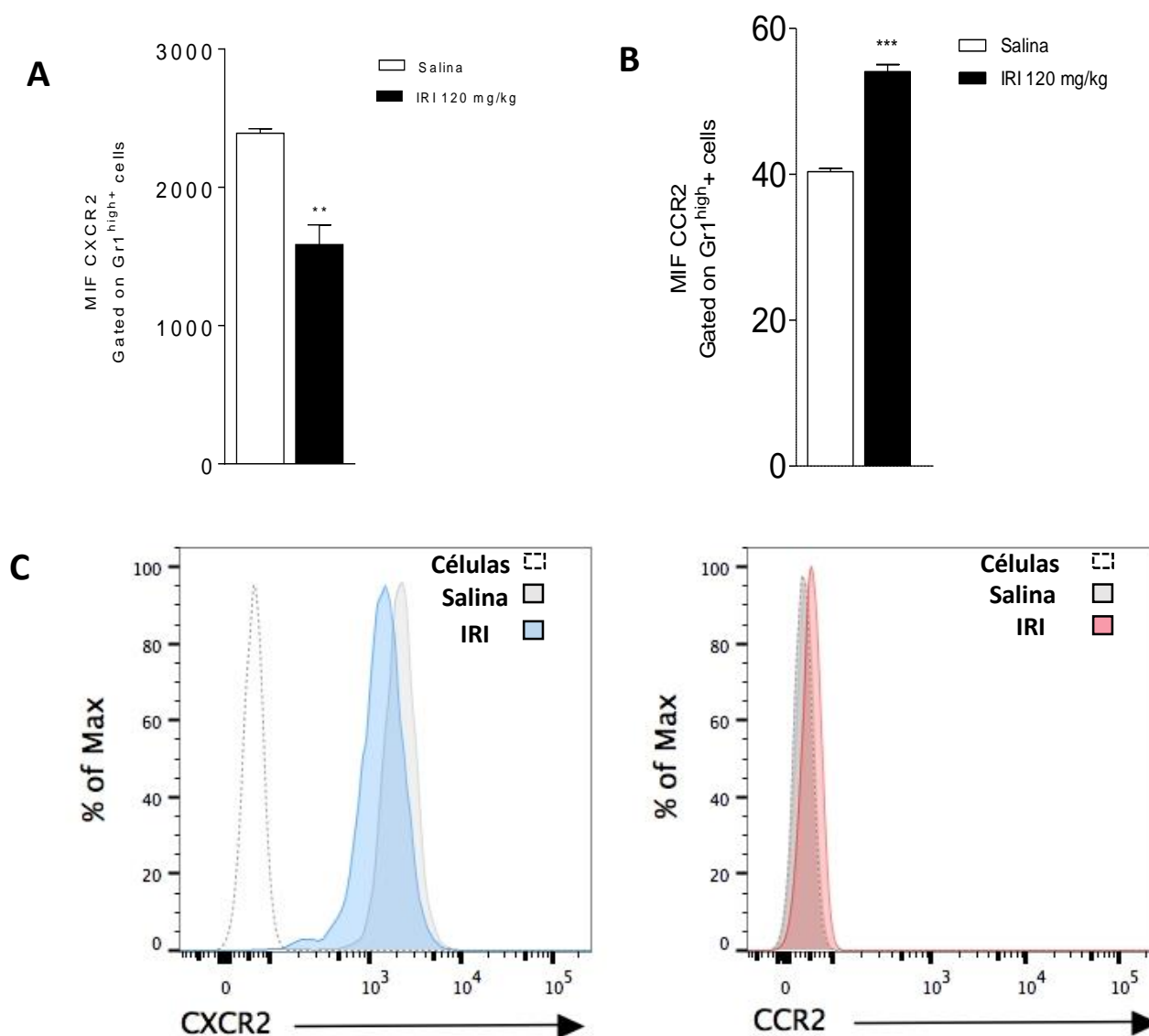
A expressão de CXCR2 foi observada por meio do ensaio de citometria de fluxo na população de células Ly6G⁺ em sangue total obtido de camundongos que receberam veículo, apenas irinotecano (IRI) ou IRI+SB (0,3 mg/kg). Os ensaios foram feitos em três tempos diferentes, D2, D5 e D7, conforme **Figura 21A e B**. O tratamento com irinotecano, sozinho ou associado ao SB225002, significativamente ($P < 0,05$) reduziu a expressão dos receptores CXCR2 quando comparado ao grupo que recebeu apenas veículo. Tal redução foi observada no D5 e persistiu no D7 (**Figura 21A**). A **Figura 21B** ilustra aquisições representativas obtidas por citometria de fluxo da expressão de CXCR2 em células Ly6G⁺. Adicionalmente, a **Figura 22** mostra que células Gr1^{High+} em animais tratados com irinotecano apresentaram uma redução na expressão de CXCR2 ($P < 0,05$), quando comparado com animais que receberam apenas salina (**Figura 22A**), além de paralelamente apresentarem um aumento ($P < 0,05$) na expressão de CCR2, em relação ao grupo salina (**Figura 22B**). Na figura 25C apresentam-se aquisições representativas das expressões dos receptores CXCR2 e CCR2 em células Gr1^{High+} registradas por citometria de fluxo.

Figura 21- Efeito do irinotecano, isolado ou associado ao SB225002, na internalização de receptores CXCR2 em neutrófilos



Os animais receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), irinotecano (120 mg/kg, i.p.) ou IRI + SB (0,3 mg/kg). Os camundongos foram anestesiados, foi colhido sangue do plexo retro-orbital e marcado com anti-Ly6G e anti-CXCR2 nos tempos D2, 24h; D5, 96h e D7, 144h após o início dos tratamentos. A expressão de CXCR2 foi verificada em neutrófilos Ly6G⁺ do sangue total. O gráfico de barras (A) expressa a mediana da intensidade de fluorescência (MIF) e o histograma (B) exprime a intensidade de fluorescência (FI). ^a $P < 0,05$ vs grupo veículo. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

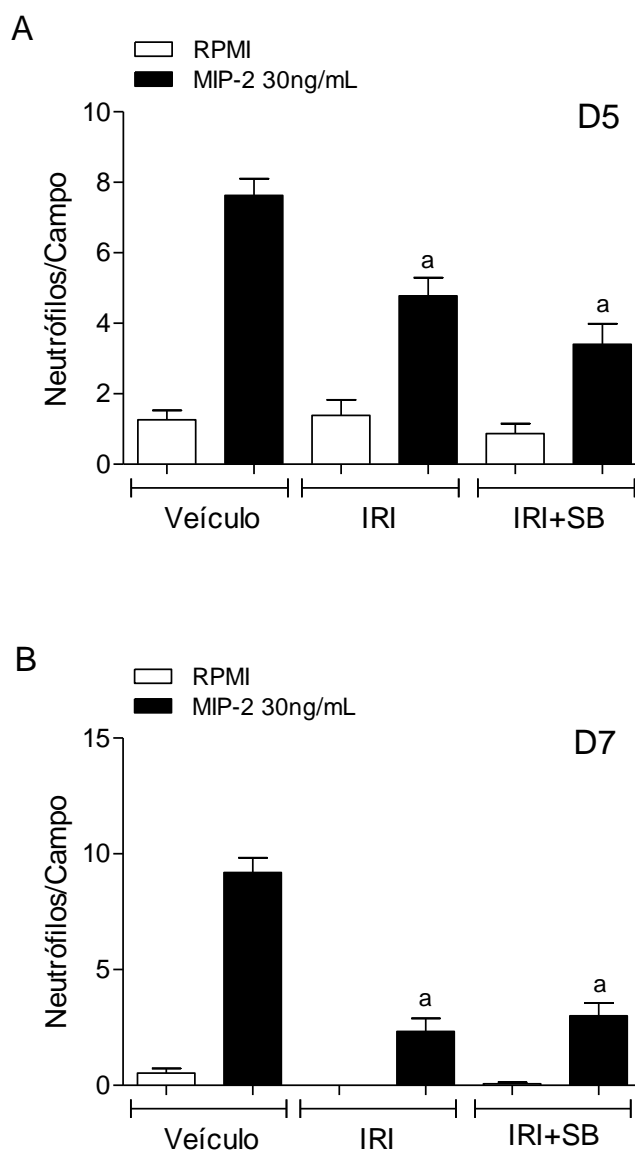
Figura 22 - Efeito do irinotecano sobre a expressão de receptores CXCR2 e CCR2 na superfície de neutrófilos



Os animais receberam veículo salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (120 mg/kg, i.p.). Os animais foram anestesiados, foi colhido sangue do plexo retro-orbital e marcado com anti-Gr1^{high}, anti-CXCR2 e anti-CCR2 no D7, 144h após o início do tratamento. A expressão de CXCR2 e de CCR2 foi verificada em neutrófilos anti-Gr1^{high+} do sangue total. Os gráficos de barras (A e B) expressam a média da intensidade de fluorescência (MIF). Gráfico A para CXCR2 e gráfico B para CCR2. O histograma (C) exprime a intensidade de fluorescência (FI). ^a $P < 0,05$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o test t não pareado.

Realizou-se, ainda, o ensaio de quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* utilizando-se como estímulo o MIP-2 (GRO- β ou CXCL2), um ligante de receptores CXCR2. Conforme ilustrado na **Figura 23**, os neutrófilos isolados de animais tratados como veículo (DMSO 2%) respondem ao estímulo quimiotático, apresentando uma migração significativamente maior ($P < 0,05$) se comparada aos neutrófilos dos mesmos animais e não expostos ao MIP-2 (**Figura 23 A e B**). Entretanto, os neutrófilos obtidos de animais que receberam irinotecano apresentaram uma reduzida capacidade de resposta ao estímulo do MIP-2 se comparado ao neutrófilo de animais tratados com DMSO ($P < 0,05$) tanto no quinto dia (**Figura 23A**) como no sétimo dia (**Figura 23B**) experimental. Resultados análogos foram observados nos neutrófilos coletados de animais injetados com SB225002 e irinotecano, cuja capacidade de migração foi comprometida em ambos os tempos estudados (**Figura 23 A e B**).

Figura 23 – Efeito do irinotecano ou da associação SB225002 e irinotecano sobre a quimiotaxia de neutrófilos isolados da medula óssea

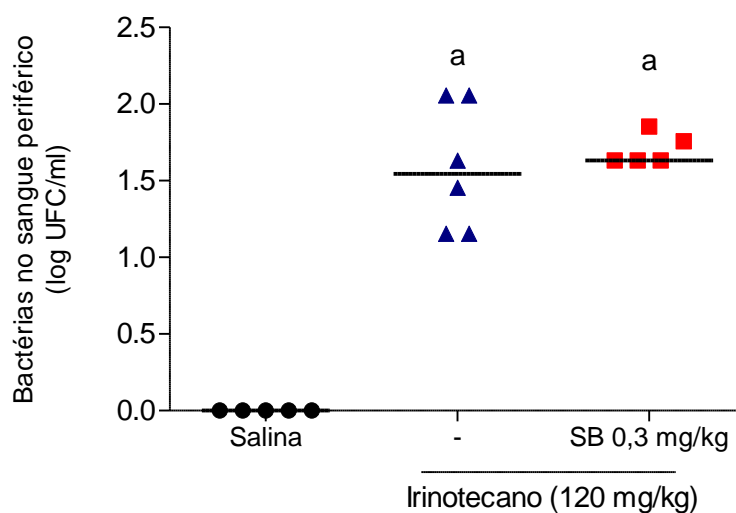


Neutrófilos isolados da medula de animais que receberam veículo (DMSO 2%, i.p.), irinotecano (120 mg/kg, i.p.) ou IRI + SB (0,3 mg/kg) foram alocados na câmara de Boyden e a migração estimulada com MIP-2 (GRO- β ou CXCL2, um ligante de CXCR2, 30 ng/ml) ou ao meio RPMI (veículo do MIP-2). Após uma hora de incubação em estufa com CO₂ a quimiotaxia foi avaliada. O painel A revela os dados obtidos no D5 e o Painel B, no D7. ^a $P < 0,05$ vs grupo MIP-2 veículo. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.4 AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA E DA LEUCOPENIA APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO

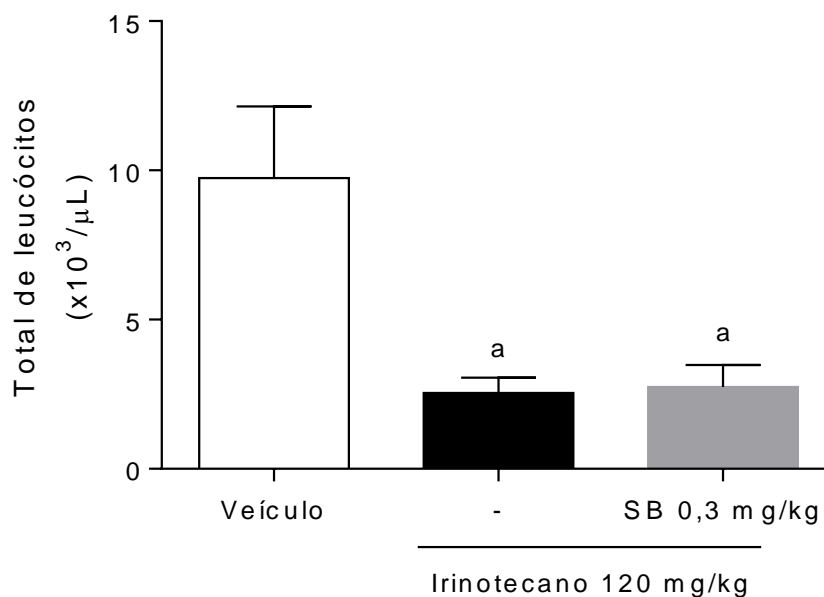
Com relação à bacteremia, avaliada no 5º dia, não se evidenciou crescimento bacteriano nas placas semeadas (dados não apresentados). No entanto, no 7º dia experimental, tanto o grupo IRI (120 mg/kg) quanto o grupo IRI+SB (0,3 mg/kg) apresentaram bacteremia positiva como ilustrado na **Figura 24**, diferindo significativamente ($P<0,05$) em ambos os casos do grupo que recebeu apenas veículo.

Figura 24 – Efeito do tratamento com o SB225002 sobre a contagem de bactérias no sangue



O número de bactérias foi avaliado no sangue, no sétimo dia após a primeira administração do irinotecano. O número total de bactérias foi estimado pelo cultivo das amostras em placas contendo meio BHI. Os resultados são expressos como Log do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de sangue. ^a $P<0,05$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

Figura 25 - Efeito do SB225002 sobre a contagem total de leucócitos em camundongos C57BL/6



Os animais receberam o veículo (DMSO 2%), Irinotecano (120 mg/kg, i.p.) ou IRI + SB225002 0,3mg/kg; durante 4 dias e foram eutanaziados no sétimo dia experimental. Os animais foram anestesiados e amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital, em seguida foi realizada a contagem do número total de Leucócitos no contador Automático de células – Colter. A figura apresenta o efeito do Irinotecano em induzir leucopenia, o que não é alterado pelo pré-tratamento com SB225002. Os valores representam a média \pm EPM do número de Leucócitos totais por $10^3/\mu\text{L}$. ^a, $P < 0,05$ vs grupo tratado com o veículo. Para análise estatística utilizou-se o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Tukey.

A **Figura 25** revela o efeito do tratamento com o SB225002 (0,3 mg/kg) por 4 dias consecutivos em associação ao irinotecano (120 mg/kg) sobre a contagem total de leucócitos nos animais sacrificados no sétimo dia após a primeira administração do antineoplásico. Observa-se que tanto o irinotecano administrado de forma isolada quanto em associação com o SB225002 (0,3 mg/kg) promoveram uma significativa ($P < 0,05$) leucopenia no sétimo dia experimental quando comparados ao grupo veículo.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que receptores CXCR2 tem papel preponderante nas fases iniciais da mucosite intestinal induzida por irinotecano, mas não nas fases tardias.

O protocolo de indução da mucosite tem sofrido alterações de acordo com as condições experimentais. Com o intuito de estudar a fisiopatologia dessa importante reação adversa, busca-se um modelo experimental que mimetize fidedignamente as alterações observadas na prática clínica.

Originalmente, o protocolo de tratamento utilizado pelo nosso laboratório, o LAFICA (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer), baseou-se no modelo proposto por IKUNO e colaboradores (1995), que utilizaram 100 mg/kg de irinotecano em camundongos, durante 4 dias consecutivos. Posteriormente, este protocolo foi modificado e adaptado por nosso grupo (MELO *et al.*, 2008). Nesse sentido, camundongos Swiss foram injetados com irinotecano na dose de 75 mg/kg durante 4 dias, com eutanásia dos animais no 7º dia após a primeira administração do quimioterápico (MELO *et al.*, 2008). Entretanto, em animais C57BL/6, obtidos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, um novo ajuste de dose do irinotecano para 60 mg/kg (i.p. por 4 dias) com eutanásia no 5º dia foi necessário, dada a mortalidade dos animais (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Em todas as condições apresentadas, a mucosite foi descrita por alterações histopatológicas e/ou morfométricas, diarreia e infiltrado inflamatório (IKUNO *et al.*, 1995; MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

De forma interessante, em experimentos preliminares no presente estudo (dados não mostrados), verificou-se que o irinotecano na dose de 75 mg/kg não foi capaz de induzir um significativo dano sobre o trato gastrointestinal. Essa resistência dos camundongos ao quimioterápico, possivelmente, se estabeleceu após a renovação das matrizes do biotério central, conferindo mudanças na microbiota desses animais o que pode implicar em diferença de sensibilidade ao antineoplásico. De fato, em uma revisão publicada por STRINGER (2013) ressaltou-se o impacto da mudança de microbiota como um dos possíveis fatores relevantes no estabelecimento da mucosite.

Dessa maneira, optou-se pela realização de uma curva dose-resposta a fim de se obter uma dose de irinotecano capaz de reproduzir as alterações histopatológicas compatíveis

com o estabelecimento de mucosite. O ensaio foi realizado com as doses de 75, 90, 105 e 120 mg/kg de irinotecano com eutanásia no 7º dia experimental.

A perda de peso é um dos sinais clínicos que mais acometem pacientes oncológicos (80% dos pacientes) em parte como uma consequência da perda de apetite, o que é exacerbado pelo uso de quimioterápicos (NCI, 2015) e por alterações absorptivas consequentes ao uso destes fármacos (SONG *et al.*, 2013). Assim, utilizamos esse parâmetro como forma de avaliar o impacto sistêmico da injeção do irinotecano. No presente trabalho, o tratamento com irinotecano em todas as doses testadas induziu de forma tempo-dependente uma significativa redução da porcentagem de massa corpórea, o que foi sugestivo de uma toxicidade sistêmica do quimioterápico.

Outro parâmetro significativamente alterado quando do estabelecimento de toxicidades sistêmicas, como a mucosite, é a sobrevida do animal, que se encontra reduzida (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014). Entretanto, no presente estudo, não se verificou mortalidade dos animais injetados com irinotecano. Conforme indicado anteriormente, a resistência dos animais pela possível mudança na microbiota pode ter contribuído para a ausência de mortalidade. Com base neste achado, questionou-se se o irinotecano estaria exercendo o mecanismo de ação quimioterápico de forma adequada, dado que efeitos colaterais, como a mucosite e mielotoxicidade, em parte se devem ao efeito de quimioterápicos em inibir a proliferação celular no intestino e na medula óssea e pelo aumento do índice de apoptose celular (WANG *et al.*, 2014). Verificamos que todas as quatro doses de irinotecano utilizadas induziram leucopenia no sétimo dia experimental. É importante salientar que em pacientes leucopênicos, muito em consequência da quimioterapia, a presença de mucosite representa um aumento no risco de sepse (BOW, 2013; SAILLARD *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a redução da proliferação de células-tronco intestinais na base das criptas impacta diretamente na altura das vilosidades (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014). De forma coerente, observamos pela análise morfométrica que as doses de 105 e 120 mg/kg de irinotecano reduziram significativamente a razão vilo/cripta e aumento de vacuolizações características de morte celular, sugerindo o estabelecimento do dano intestinal comum à mucosite. Os dados desse trabalho estão de acordo com o demonstrado por MELO e colaboradores (2008) que demonstraram que o dano de mucosa foi evidenciado por áreas intestinais desnudas, com perda da altura de vilos e de células epiteliais intestinais, vacuolização e necrose

celular. A literatura relata que essa alteração da arquitetura intestinal muito está associada ao intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria, dado que a modulação farmacológica de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral- α , e interleucina-1 β (MELO *et al.*, 2008), óxido nítrico (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012), interleucina-18 (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014) e interleucina-33 (GUABIRABA *et al.*, 2014), reduz o influxo de neutrófilos e o dano histopatológico. Neste sentido, verificamos que o irinotecano aumentou o infiltrado neutrofílico nos segmentos de íleo com um pico no quinto dia e uma redução no sétimo dia experimental, mas ainda com diferenças significativas quando comparado ao grupo salina, o que corroborou com os achados de WONG (2013).

A diarreia tem sido evidenciada, na prática clínica (entre pacientes que fazem uso de irinotecano) e nos modelos laboratoriais, como o sintoma mais importante da mucosite. Em estudos de nosso laboratório (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012), bem como naqueles publicados por pesquisadores de outros grupos (IKUNO *et al.*, 1995; KURITA *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2003, 2007; LOGAN *et al.*, 2008 a,b; STRINGER *et al.*, 2007b, 2009a) descreve-se que o irinotecano além de induzir uma marcante perda de peso dos animais, infiltração neutrofílica e dano histopatológico no intestino, também promove o desenvolvimento de diarreia grave. Entretanto, no presente estudo, não observamos o aparecimento de diarreia em nenhum dos grupos injetados com irinotecano, mas sim, todos apresentando fezes sólidas e ressecadas. Apesar de o tratamento baseado em irinotecano estar associado ao surgimento frequente de diarreia grave em 25% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007), constipação grave também pode ser observada em 4% dos pacientes (LORDICK *et al.*, 2003; HARTMANN *et al.*, 2004), como uma consequência do endurecimento das fezes. Tais diferenças entre a capacidade do irinotecano em induzir diarreia ou constipação não estão claras do ponto de vista de mecanismo. Contudo, mudanças no padrão da microbiota podem ser responsáveis por essa variação de perfil clínico, como o parece ser na síndrome do intestino irritável e na constipação idiopática crônica (FORD *et al.*, 2014). Entretanto, mesmo não se evidenciando diarreia, realizamos a coleta do intestino delgado para a mensuração do conteúdo de massa sólida. De maneira interessante, o grupo injetado com irinotecano apresentou um conteúdo sólido reduzido se comparado ao grupo tratado com salina, indicando que as alterações histopatológicas contribuem para o maior acúmulo de líquidos no intestino, compatível com o estabelecimento de mucosite e que poderia levar à diarreia. É possível que o maior aporte de líquidos drenado para o cólon seja

compensado pelo processo absorptivo nesta região anatômica e, portanto, a formação normal de bolo fecal. Tal hipótese ainda precisa ser investigada.

Até então, os modelos de mucosite utilizados em nosso laboratório tinham a diarreia como um evento imprescindível que acompanhava as demais alterações intestinais. No entanto, dados do presente trabalho mostram que o uso de irinotecano foi capaz de reproduzir alterações inflamatórias características da mucosite intestinal, como lesão histopatológica, com alterações morfológicas, e infiltrado celular de neutrófilos, mas sem o surgimento da diarreia. Portanto, verificou-se, de fato, que a mucosite foi instalada. O próximo passo em nossa investigação foi estudar o papel de receptores CXCR2 de quimiocinas, mediante bloqueio com o antagonista SB225002, na mucosite induzida por irinotecano.

Como descrito anteriormente, sabe-se que na mucosite intestinal por irinotecano há aumento do infiltrado de neutrófilos (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014). Embora a importância dos neutrófilos esteja na sua capacidade de eliminar os patógenos, seu recrutamento excessivo pode causar dano tecidual.

Em estudos anteriores de nosso laboratório realizados em camundongos Swiss (dados não mostrados), em que se utilizou uma curva dose-resposta do SB225002 (0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg), em associação com o irinotecano, revelou que a concentração de 0,3 mg/kg foi a mais promissora na redução do infiltrado neutrofílico agudo (24 h após irinotecano) em segmentos intestinais de íleo. Então, nos estudos que se seguiram, utilizando animais C57BL/6, optou-se pelo uso de SB225002 na dose de 0,3 mg/kg. Corroborando com essa informação, BENTO e colaboradores (2008) utilizaram o SB225002 na colite induzida por TNBS e observaram que a dose com melhor desempenho na redução dos parâmetros inflamatórios foi a de 0,3 mg/kg. Neste caso, o SB225002 foi usado de forma preventiva, 24 h antes da indução da colite. Com o uso do antagonista de CXCR2 os autores observaram redução do influxo de neutrófilos, reduzidos níveis de IL1- β , de MIP-2 e de KC, menor atividade de MPO. Além disso, eles evidenciaram níveis significativamente maiores de citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10, no cólon de animais tratados com SB225002, em comparação aos animais que receberam apenas o TNBS (BENTO *et al.*, 2008).

No presente trabalho, o uso de SB225002 (0,3 mg/kg) em associação ao irinotecano (120 mg/kg) foi capaz de prevenir o aumento da atividade da mieloperoxidase apenas no tempo de 24h após o início dos tratamentos, quando comparados com o grupo que recebeu apenas irinotecano. Tal prevenção não foi observada nos tempos de 96 e 144h após a primeira dose de irinotecano. Adicionalmente, o tratamento dos animais com o SB225002 não preveniu o estabelecimento das alterações morfométricas histopatológicas ou a redução do comprimento do intestino relacionado à injeção do irinotecano, observando-se ainda um agravamento dessas alterações quando comparado ao grupo injetado somente com irinotecano. Neste ponto, dois aspectos devem ser destacados: 1) o antagonismo sobre os receptores CXCR2 sugere que estes são importantes para a migração precoce dos neutrófilos, mas não para a migração tardia, na mucosite; 2) o retardo precoce na migração dos neutrófilos *in vivo*, no contexto da mucosite, parece contribuir para um maior agravamento da lesão em tempos tardios.

Em relação ao primeiro ponto tratado anteriormente, sabe-se que os neutrófilos são importantes nas respostas inflamatórias ao realizarem funções efetoras no controle imunológico das infecções (APPELBERG, 2007; NATHAN, 2006). Adicionalmente, a deficiência na função efetora dessas células pode contribuir para o aumento da gravidade de infecções bacterianas e fúngicas (LEKSTROM-HIMES & GALLIN, 2000). Em um estudo de BRUBAKER e colaboradores (2013) verificou-se que em um modelo de ferida cutânea infectada em camundongos de 18 a 20 meses de idade, a capacidade quimiotática de neutrófilos encontra-se reduzida e que, conseqüentemente, o fechamento da ferida infectada é retardado quando comparado a camundongos jovens de 3 a 4 meses de idade (BRUBAKER *et al.*, 2013). De forma interessante, Benjamim e colaboradores demonstraram que na sepse, o óxido nítrico contribui para a falência da migração de neutrófilos, aumentando a mortalidade de animais submetidos ao modelo de ligadura e punção do ceco (CLP), visto que a inibição da enzima óxido nítrico sintase induzida com aminoguanidina aumentou a sobrevivência de animais com sepse grave (BENJAMIM *et al.*, 2000). Essas observações sugerem que a migração de neutrófilos em estágios iniciais parece ser crucial para o controle de infecções.

Em relação ao segundo ponto tratado anteriormente, relativo ao agravamento da mucosite em tempos tardios, questionamos se a perda da eficácia do antagonista dos receptores CXCR2 seria devida a uma redução da produção de quimiocinas ligantes deste receptor, como é o caso da keratinocyte chemokine (KC), um análogo murino da IL-8

humana, ou do aumento da resposta inflamatória geral. Ao se comparar o tempo de 96 h com o de 24 h após a injeção do irinotecano, percebeu-se um aumento da produção de KC e de IL-1 β , além de uma redução de interferon-gama (IFN- γ) no grupo irinotecano. É relevante salientar, ainda, que em nosso modelo experimental há um pico de migração de neutrófilos no quinto dia após a primeira injeção de irinotecano, havendo, no sétimo dia, uma redução significativa dessa migração. Entretanto, como observado em nossos resultados, o decaimento da migração dos neutrófilos *in vivo* no sétimo dia, não se deveu a uma redução significativa da produção de KC, havendo ainda um reforço da resposta imunológica adaptativa detectada pelo aumento da produção de IFN- γ (FRASCA *et al.*, 1985) no grupo tratado com SB225002. Em adição a esse achado, ao se observar a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos coletados de animais tratados com irinotecano ou com SB225002 associado ao irinotecano percebeu-se uma redução significativa da capacidade quimiotática desses neutrófilos frente ao CXCL2 (MIP-2), um ligante de receptores CXCR2.

O receptor CXCR2 é altamente expresso em neutrófilos e a sinalização deste é fundamental para o recrutamento dessas células para o sítio inflamatório (HOMES *et al.*, 1991). Um aspecto que se poderia especular seria: se a produção do ligante de CXCR2 está normal, a redução da migração dos neutrófilos no sétimo dia seria por uma redução na expressão desse receptor? Curiosamente, verificamos por citometria de fluxo que houve uma significativa redução da expressão de receptores CXCR2 em neutrófilos. Sabe-se que uma redução na expressão desses receptores contribui para a falência do recrutamento de neutrófilos em situações de sepse (CUMMINGS *et al.*, 1999; RIOS-SANTOS *et al.*, 2007). Demonstrou-se, adicionalmente, que o óxido nítrico é relevante no processo de internalização de receptores CXCR2 (RIOS-SANTOS *et al.*, 2007). De fato, nosso grupo demonstrou previamente a participação do óxido nítrico na mucosite induzida por irinotecano uma vez que a inibição da síntese deste mediador reduziu a gravidade da lesão intestinal (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Tal observação pode justificar o decaimento da migração dos neutrófilos durante a mucosite intestinal em fases tardias (superprodução de óxido nítrico), *in vivo*, de forma análoga ao descrito na sepse (BENJAMIM *et al.*, 2000).

Outros mecanismos que podem levar à redução na expressão de receptores CXCR2 na superfície de neutrófilos inclui a superfamília dos receptores Toll-like/Interleucina-1.

A citocina IL-1 β é membro da família da interleucina-1, que também inclui IL-18 e IL-33 (SCHMITZ *et al.* 2005). Todas essas citocinas da família da IL-1 já tiveram seu papel estudado na mucosite intestinal induzida por irinotecano.

LIMA-JÚNIOR e colaboradores (2014) demonstraram que animais *knockout* para IL-18 que receberam irinotecano apresentaram melhora nos parâmetros funcionais intestinais (diarreia e hipercontratilidade de tiras isoladas de intestino), além de reduzida alteração histopatológica e menor infiltrado de neutrófilos no intestino quando comparado ao grupo selvagem injetado com irinotecano. Foi observado, ainda, que a administração da proteína ligante para IL-18 (IL-18bp), que bloqueia a função biológica pró-inflamatória da IL-18, apresentou resultados similares à deleção gênica para IL-18.

Quanto a IL-33, outro membro da família da IL-1, GUABIRABA e colaboradores (2014) demonstraram que esta citocina, sinalizando via receptor ST2, tem papel central na patogênese da mucosite. Ensaio de ELISA mostrou que ambos IL-33 e ST2 estão aumentados no intestino delgado de animais que receberam irinotecano. Os autores destacaram que o bloqueio da via IL-33/ST2, seja por meio da utilização de animais *knockout* para ambos ou uso do receptor solúvel (sST), implicou na proteção dos eventos inerentes à mucosite. Comprovou-se adicionalmente que a administração exógena de IL-33 potencializa a mucosite intestinal, aumentando o infiltrado inflamatório neutrofílico, os escores de lesão histopatológicos, a perda de peso e o encurtamento do intestino delgado.

A via IL-33/ST2 está envolvida na produção de quimiocinas CXCL1/KC, CXCL2/MIP-1 e CCL2/JE pelas células epiteliais intestinais e no recrutamento de neutrófilos para o local da inflamação. A depleção destes últimos, com um anticorpo anti-neutrófilo, atenuou a lesão intestinal e os demais eventos associados à mucosite intestinal. Por ensaios de qPCR, os autores mostraram bacteremia em animais tratados com IRI e correlacionaram esse aumento com a IL-33, mostrando que o aumento da contagem de bactérias se deu de forma ST2-dependente (GUABIRABA *et al.* 2014).

Além disso, observou-se a participação dos receptores Toll-like tipo 2 (TLR2) e 9 (TLR9) na mucosite intestinal induzida por irinotecano (WONG, 2013; WONG *et al.*, 2015). Nesses estudos, a deficiência de receptores TLR2 previne a ativação do NF- κ B, a produção de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento do dano intestinal e a

diarreia. Adicionalmente, a deficiência dos receptores TLR9 somente melhora o somente do processo inflamatório (WONG, 2013; WONG *et al.*, 2015).

Os receptores para IL-18, IL-33, bem como os TLR2 e TLR9, sinalizam por uma via intracelular comum, de forma dependente da proteína adaptadora MyD88, e também foram estudados em modelos de sepse induzida por CLP. Por exemplo, no modelo de sepse grave induzida por CLP, o papel deletério de TLRs se deve à produção de TNF- α , gerando um aumento da expressão de iNOS via TNFR (receptor de TNF- α), com consequente ativação da proteína GRK2 (Quinase tipo 2 de receptores acoplados à proteína G - GPCRs) a qual fosforila receptores CXCR2 promovendo, por fim, uma redução da expressão (*downregulation*) destes e a consequente falência da migração de neutrófilos para o sítio de lesão (ALVES-FILHO *et al.*, 2009; TREVELIN *et al.*, 2012; SÔNIGO *et al.*, 2014). A fosforilação dos GPCRs por GRKs aumenta a afinidade destes receptores pela proteína adaptadora arrestina, o que permite a endocitose (FERGUSON *et al.*, 1996; MOORE *et al.*, 2007). Em pacientes sépticos a maior expressão de GRK2 em neutrófilos foi relacionada ao prejuízo na quimiotaxia dos neutrófilos em direção a CXCL8 (ARRAES *et al.*, 2006). De forma interessante, no nosso trabalho, evidenciou-se importante bacteremia no 7º dia experimental, em ambos os grupos SB 0,3 mg/kg + IRI 120 mg/kg e IRI 120 mg/kg. WONG (2013) observou, além da bacteremia, aumento da translocação bacteriana gram-negativa (*Escherichia coli* e *Pseudomona aeruginosa*) para órgãos estéreis tais como linfonodo mesentérico e fígado, em animais tratados com irinotecano, bem como sinais sugestivos de sepse, como leucopenia, infiltrado neutrofílico no pulmão e uma diminuição da temperatura retal (WONG, 2013), achado similar evidenciado no modelo clássico de sepse por CLP.

Como simultaneamente à bacteremia constatamos a internalização do receptor CXCR2, é possível que, no caso da mucosite intestinal, a melhora da lesão quando há inibição da função de receptores da superfamília TLR/IL-1 β , ocorra devido a uma melhora da qualidade da migração do neutrófilo e a eficiência do combate às infecções locais pela manutenção da expressão de receptores CXCR2, o que precisa ainda ser investigado. Em resumo, a ativação dos receptores CXCR2 tem muita importância no contexto da mucosite, principalmente nas fases iniciais.

Contudo, uma pergunta ainda precisava ser respondida: por que o neutrófilo continuava a migrar durante a mucosite mesmo com a internalização dos receptores CXCR2?

De forma inédita, neste trabalho, demonstramos que simultaneamente à internalização do CXCR2, após o tratamento com o irinotecano, ocorre o aumento da expressão de receptores CCR2 nos neutrófilos. Essa observação pode explicar, no contexto da mucosite, a importante migração de neutrófilos para órgãos distantes como o pulmão (WONG, 2013) e de forma análoga ao visualizado na sepse (SOUTO *et al.*, 2011).

Como dito anteriormente, no modelo de sepse, foi demonstrado que a ativação de TLR4 pelo LPS promove redução na expressão de receptores CXCR2 em neutrófilos durante a sepse (ALVES-FILHO *et al.*, 2010) e aumento na expressão de CCR2 (SOUTO *et al.*, 2011). Além disto, foi demonstrado que animais CCR2^{-/-} apresentam maior resistência à sepse grave que está associada à diminuição do infiltrado neutrofílico em órgãos secundários e consequente redução da lesão tecidual (SOUTO *et al.*, 2011).

Obviamente, apesar das semelhanças acima citadas entre mucosite e sepse, o modelo de sepse induzida por CLP (ALVES-FILHO *et al.*, 2009; FREITAS *et al.*, 2009; SECHER *et al.*, 2009) apresenta diferenças relevantes quando comparado ao modelo de mucosite intestinal induzida pelo irinotecano. Na sepse por CLP, o ceco do animal é exposto e perfurado fazendo com que o conteúdo fecal seja extravasado na cavidade abdominal desencadeando uma sepse polimicrobiana. Sabe-se que a gravidade da doença é diretamente proporcional à quantidade de bactérias extravasada na cavidade (BENJAMIM *et al.*, 2000). Em nosso modelo, o perfil de bactérias em translocação parece ser distinto daquele observado no modelo de CLP, justificando um padrão de resposta fisiopatológica diferenciado e mais brando.

Recentemente, SÔNEGO e colaboradores (2014) publicaram uma revisão sistemática sobre o papel dos neutrófilos na sepse. Os autores enfatizaram os mecanismos que levam à internalização de CXCR2, mostrando que concomitante à dessensibilização desse receptor quimiotático, há a expressão de outros dois receptores na superfície dos neutrófilos. Em condições normais, neutrófilos não expressam receptores CC em sua superfície. Mas em neutrófilos em contexto de sepse, há aumento da expressão de, principalmente, CCR2 e CCR5, sendo que o CCR2 está associado ao recrutamento de neutrófilos para órgãos secundários, como pulmão por exemplo (SÔNEGO *et al.*, 2014).

Assim, apesar de a inibição dos receptores CXCR2 não ter sido efetiva em modular o curso da mucosite, evidenciou-se um importante papel destes receptores nas fases precoces desta doença. Possivelmente, pensando-se em um contexto terapêutico, parece ser mais lúcida a ideia da modulação de vias inflamatórias que levam à desregulação da migração de neutrófilos por alterar a expressão de receptores de quimiocinas e não destes receptores diretamente.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, realizou-se a padronização da mucosite intestinal para as novas condições experimentais, inclusive com a incorporação de parâmetros de dano tecidual, como o comprimento do intestino. Verificou-se ainda, que o bloqueio de receptores CXCR2 não previne o estabelecimento da mucosite, conforme detectado por parâmetros histopatológicos, morfométricos e de translocação bacteriana, provavelmente devido a uma participação apenas na fase precoce da mucosite intestinal. Em fases tardias, o receptor CXCR2 é internalizado e substituído pelo CCR2 na superfície dos neutrófilos. Por fim, sugere-se que a mucosite induzida pelo irinotecano evolui para sepse, possivelmente pela redução da capacidade de migração dos neutrófilos, o que foi relacionado ao uso do quimioterápico.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Imunologia celular e molecular. Tradução da 5ª edição, Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, 2005.

ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Tradução da 8ª edição, São Paulo, Saunders Elsevier, 2010.

ALIMONTI A, GELIBTERA A, PAVESE I, SATTA F, COGNETTI F, FERRETTI G, RASIO D, VECCHIONE A, DI PALMA M. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer Treat Rev.** v.30, n. 6, p.555-562, 2004.

ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, RUSSO M, CUNHA FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med.** v.34, n.2, p. 461-470, 2006.

ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SOUTO FO, SPILLER F, PAULA-NETO H, SILVA JS, GAZZINELLI RT, TEIXEIRA MM, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 106, n.10, p. 4018-4023, 2009.

ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, SPILLER F, SOUTO FO, CUNHA FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock.**; v. 1, n.2, p. 3-9, 2008.

ALVES-FILHO JC, BENJAMIM C, TAVARES-MURTA BM, CUNHA FQ. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 1, n.2, p.223-226, 2005.

ALVES-FILHO JC, SÔNEGO F, SOUTO FO, FREITAS A, VERRI WA JR, AUXILIADORA-MARTINS M, BASILE-FILHO A, MCKENZIE AN, XU D, CUNHA FQ, LIEW FY. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nat Med.** v. 16, n.6, p.708-712, 2010.

APPELBERG R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends Microbiol.** v.15, n.2, p.87-92, 2007.

ARIFA RD, MADEIRA MF, DE PAULA TP, LIMA RL, TAVARES LD, MENEZES-GARCIA Z, FAGUNDES CT, RACHID MA, RYFFEL B, ZAMBONI DS, TEIXEIRA MM, SOUZA DG. Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 β and IL-18 in mice. **Am J Pathol.** v.184, n.7, p. 2023-2034, 2014.

ARMAND JP, DUCREUX M, MAHJOUBI M, ABIGERGES D, BUGAT R, CHABOT G, HERAIT P, DE FORNI M, ROUGIER P. CPT-11 (irinotecan) in the treatment of colorectal cancer. **Eur J Cancer.** v.31A, n.7-8, p.1283-1287, 995.

ARRAES SM, FREITAS MS, DA SILVA SV, DE PAULA NETO HA, ALVES-FILHO JC, AUXILIADORA MARTINS M, BASILE-FILHO A, TAVARES-MURTA BM, BARJA-FIDALGO C, CUNHA FQ. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood.** v.108, n.9, p.2906-2913, 2006.

BENJAMIM CF, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis.** v. 182, n.1, p.214-223, 2000.

BENJAMIM CF, SILVA JS, FORTES ZB, OLIVEIRA MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect Immun.** v.70, n.10, p.3602-3610, 2002.

BENTO AF, LEITE DF, CLAUDINO RF, HARA DB, LEAL PC, CALIXTO JB. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J Leukoc Biol.** v.84, n.4, p.1213-1221, 2008.

BHUSHAN S, MCLEOD H, WALKO CM. Role of pharmacogenetics as predictive biomarkers of response and/or toxicity in the treatment of colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer.** v.8, n.1, p.15-21, 2009.

BOW EJ. Infection in neutropenic patients with cancer. **Crit Care Clin.** v.29, n.3, p.411-441, 2013.

BRUBAKER AL, RENDON JL, RAMIREZ L, CHOUDHRY MA, KOVACS EJ. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of

cutaneous wound infection with advanced age. **J Immunol.** V.190, n.4, p.1746-1757, 2013.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINONOFF, P.B. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. 10. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-hill Interamericana, 2003. s. 10, p. 1040-93.

CHAMPOUX JJ. DNA topoisomerases: structures, function, and mechanism. **Annu Rev Biochem.** v.70, n.5, p.369–413, 2001.

CHEN A, CHEN P, CHEN Y. DNA topoisomerase I drugs and radiotherapy for lung cancer. **J Thorac Disc.** v.4, n.4, p.390-397, 2012.

CHEN GY, NUÑEZ G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol.** v.10, n.12, p.826-837, 2010.

CHESTER JD, JOEL SP, CHEESEMAN SL, HALL GD, BRAUN MS, PERRY J, DAVIS T, BUTTON CJ, SEYMOUR MT. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J Clin Oncol.** v.21, n.6, p.1125-1132, 2003.

COLOBRAN R, PUJOL-BORRELL R, ARMENGOL MP, JUAN M. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. **Clin Exp Immunol.** v.148, n.2, p.208-217, 2007.

CUMMINGS CJ, MARTIN TR, FREVERT CW, QUAN JM, WONG VA, MONGOVIN SM, HAGEN TR, STEINBERG KP, GOODMAN RB. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. **J Immunol.** v.162, n.4, p.2341-2346, 1999.

CUNNINGHAM D, PYRHONEN S, JAMES RD, PUNT CJ, HICKISH TF, HEIKKILA R, JOHANNESSEN TB, STARKHAMMAR H, TOPHAM CA, AWAD L, JACQUES C, HERAIT P. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. **Lancet.** v.352, p. 1413-1418, 2008.

FERGUSON SS, ZHANG J, BARAK LS, CARON, MG. G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration. **Biochem Soc Trans.** v.24, n.4, p.953-959, 1996.

FILIKO J, LAZARUS HM, FLOMENBERG N. Mucosal injury in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: new approaches to prophylaxis and treatment. **Bone Marrow Transplant.** v.31, n.1, p.1-10, 2003.

FORD AC, QUIGLEY EM, LACY BE, LEMBO AJ, SAITO YA, SCHILLER LR, SOFFER EE, SPIEGEL BM, MOAYYEDI P. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-analysis. **Am J Gastroenterol.** v.109, n.10, p.1547-1561, 2014.

FRASCA D, ADORINI L, LANDOLFO S, DORIA G. Enhancing effect of IFN-gamma on helper T cell activity and IL 2 production. **J Immunol.** v.134, n.6, p.3907-3911, 1985.

FREITAS A, ALVES-FILHO JC, VICTONI T, SECHER T, LEMOS HP, SÔNEGO F, CUNHA FQ, RYFFEL B. IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis. **J Immunol.** v.182, p.7846-7854, 2009.

GIBSON RJ, BOWEN JM, INGLIS MR, CUMMINS AG, KEEFE DM. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J Gastroenterol Hepatol.** v.18, n.9, p.1095-1100, 2003.

GIBSON RJ, BOWEN JM, ALVAREZ E, FINNIE J, KEEFE DM. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy.** v.53, n.5, p.360-369, 2007.

GUABIRABA R, BESNARD AG, MENEZES GB, SECHER T, JABIR MS, AMARAL SS, BRAUN H, LIMA-JUNIOR RC, RIBEIRO RA, CUNHA FQ, TEIXEIRA MM, BEYAERT R, GRAHAM GJ, LIEW FY. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol.** v.7, n.5, p.1079-1093, 2014.

GUICHARD S, TERRET C, HENNEBELLE I, LOCHON I, CHEVREAU P, FRÉTIGNY E, SELVES J, CHATELUT E, BUGAT R. CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. **Br J Cancer.** v.80, p.364-370, 1999.

GROVES DT, JIANG Y. Chemokines, a Family of Chemotactic Cytokines. **Crit Rev Oral Biol Med.** v.6, n.2, p.109-118, 1995.

HARTMANN JT, OECHSLE K, JÄGER E, REIS HE, HAAG C, NIEDERLE N, WILKE HJ, PFLÜGER KH, BATRAN SA, BÜCHELE T, HOFHEINZ RD, KANZ L, BOKEMEYER C. Prospective multicenter phase II study of irinotecan as third-line therapy in metastatic colorectal cancer and progression after bolus and infusional 5-fluorouracil. **Anticancer Drugs.** v.15, n.5, p.473-477, 2004.

HOLMES WE, LEE J, KUANG WJ, RICE GC, WOOD WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science.* 1991. 253: 1278-1280. **J Immunol.** v.183, n.5, p.2895-2897, 2009.

IKUNO, N., SODA H, WATANABE M, OKA M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and caecum. **J Natl Cancer Inst.** v.87, p.1876-1788, 1995.

JANETPOULOS C, FREITAS RA. Directional sensing during chemotaxis. **FEBS Lett.** v.582, n.14, p.2075-2085, 2008.

KEEFE DM, SCHUBERT MM, ELTING LS, SONIS ST, EPSTEIN JB, RABER-DURLACHER JE, MIGLIORATI CA, MCGUIRE DB, HUTCHINS RD, PETERSON DE; Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer.** v.109, n.5, p.820-831, 2007.

KOELINK PJ, OVERBEEK SA, BRABER S, DE KRUIJF P, FOLKERTS G, SMIT MJ, KRANEVELD AD. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. **Pharmacol Ther.** v.133, n.1, p.1-18, 2012.

KOIZUMI F, KITAGAWA M, NEGISHI T, ONDA T, MATSUMOTO S, HAMAGUCHI T, MATSUMURA Y. Novel SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor-Secreting Bulky Tumors. **Cancer Res.;** v.66, n.20, p.10048-10056, 2006.

KURITA A, KADO S, KANEDA N, ONOUE M, HASHIMOTO S, YOKOKURA T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.46, n.3, p.211-220, 2000.

LAZENNEC G, RICHMOND A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. **Trends Mol Med.** v.16, n.3, p.133–144, 2010.

LEKSTROM-HIMES JA, GALLIN JI. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. **N Engl J Med.** v.343, n.23, p.1703-1714, 2000.

LIMA-JUNIOR RC. **Estudo morfofuncional e dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos: Papel da Caspase-1, Interleucina-18 e óxido nítrico.** Fortaleza; 2008. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará].

LIMA-JÚNIOR RC, FIGUEIREDO AA, FREITAS HC, MELO ML, WONG DV, LEITE CA, MEDEIROS RP, MARQUES-NETO RD, VALE ML, BRITO GA, ORIÁ RB, SOUZA MH, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.69, n.4, p.931-942, 2012.

LIMA-JÚNIOR RC, FREITAS HC, WONG DV, WANDERLEY CW, NUNES LG, LEITE LL, MIRANDA SP, SOUZA MH, BRITO GA, MAGALHÃES PJ, TEIXEIRA MM, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Pharmacol.** v.171, n.9, p.2335-2350, 2014.

LIU YQ, LI WQ, MORRIS-NATSCHKE SL, QUIAN K, YANG L, ZHU GX, WU XB, CHEN AL, ZHANG SY, NAN X, LEE KH. Perspectives on Biologically Active Camptothecin Derivatives. **Med Res Rev.** v.35, n.4, p.753-789, 2015.

LOGAN RM, STRINGER AM, BOWEN JM, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DM. Serum levels of NFκB and drug pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol Ther.** v.7, n.7, p.1139-1145, 2008a.

LOGAN RM, GIBSON RJ, BOWEN JM, STRINGER AM, SONIS ST, KEEFE DM. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.62, n.1, p.33-41, 2008b.

LORDICK F, VON SCHILLING C, BERNHARD H, HENNIG M, BREDENKAMP R, PESCHEL C. Phase II trial of irinotecan plus docetaxel in cisplatin-pretreated relapsed or refractory oesophageal cancer. **Br J Cancer.** v.89, n.4, p.630-633, 2003.

LUPPI F, LONGO AM, DE BOER WI, RABE KF, HIEMSTRA PS. Interleukin-8 Stimulates Cell Proliferation in Non-Small cell Lung Cancer through Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. **Lung Cancer.** v.56, n.1. p.25-33, 2007.

MAEDA S, OHNO K, NAKAMURA K, UCHIDA K, NAKASHIMA K, FUKUSHIMA K, TSUKAMOTO A, GOTO-KOSHINO Y, FUJINO Y, TSUJIMOTO H. Quantification of chemokine and chemokine receptor gene expression in duodenal mucosa of dogs with inflammatory bowel disease. **Vet Immunol Immunopathol.** v.144, n.3-4, p.290-298, 2011.

MARTIN GR, WALLACE JL. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. **Exp Biol Med.** v.231, n.2, p.130-137, 2006.

MEDZHITOV R, JANEWAY C Jr. Innate immunity. **N Engl J Med.** v.343, p.338-344, 2000.

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature.** v.454, p.428-435, 2008.

MEDZHITOV, R., D.S. SCHNEIDER, AND M.P. SOARES. Disease tolerance as a defense strategy. **Science.** v.335, n.6071, p.936-941, 2012.

MELO ML, BRITO GA, SOARES RC, CARVALHO SB, SILVA JV, SOARES PM, VALE ML, SOUZA MH, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.61, n.5, p.775-784, 2008.

MOORE CA, MILANO SK, BENOVIC JL. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. **Annu Rev Physiol.** v.69, p.451-482, 2007.

MORTIER A, VAN DAMME J, PROOST P. Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. **Immunol Lett.** v.145, n.1-2, p.2-9, 2012.

MOSER B, WOLF M, WALZ A, LOETSCHER P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol.** v.25, n.2, p.75-84, 2004.

NATHAN C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat Rev Immunol.** v.6, n.3, p.173-182, 2006.

NCI, National Institute of Cancer. Nutrition in Cancer Care—for health professionals (PDQ®). Disponível em <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/side-effects/appetite-loss/nutrition-hp-pdq> (Acessado em 18 Setembro 2015).

NOVELLI GP. Role of free radicals in septic shock. **J Physiol Pharmacol.** v.48, n.4, p.517-527, 1997.

PARIS F, FUKS Z, KANG A. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiation intestinal damage in mice. **Science.** v.293, p.293-297, 2001.

PARRILLIG, IAFFAIOLI RV, MARTORANO M, CUOMO R, TAFUTO S, ZAMPINO MG, BUDILLON G, BIANCO AR. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. **Cancer Res.** v.49, n.13, p.3689-3691, 1989.

PEASE JE, SABROE I. The role of interleukin-8 and its receptors in inflammatory lung disease: implications for therapy. **Am J Respir Med.** v.1, n.1, p.19-25, 2002.

RIOS-SANTOS F, ALVES-FILHO JC, SOUTO FO, SPILLER F, FREITAS A, LOTUFO CM, SOARES MB, DOS SANTOS RR, TEIXEIRA MM, CUNHA FQ. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med.** v.175, n.5, p.490-497, 2007.

SAILLARD C, SANNINI A, CHOW-CHINE L, BLACHE JL, BRUN JP, MOKART D. Febrile neutropenia in onco-hematology patients hospitalized in Intensive Care Unit. **Bull Cancer.** v.102, n.4, p.349-359, 2015.

SANCHIS J, CANAL F, LUCAS R, VICENT MJ. Polymer-drug conjugates for novel molecular targets. **Nanomedicine (Lond)**. v.5, n.6, p.915-935, 2010.

SANZ MJ, PAUL K. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. **Europ J Immunol**. v.42, n.2, p.278-283, 2012.

SCHMITZ J, OWYANG A, OLDHAM E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**. v.23, p.479-490, 2005.

SCULLY C, SONIS S, DIZ PD. Oral mucositis. **Oral Dis**. v.12, n.3, p.229-241, 2006.

SECHER T, VASSEUR V, POISSON DM, MITCHELL JA, CUNHA FQ, ALVES-FILHO JC, RYFFEL B. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. **J Immunol**. v.182, p.7855-7864, 2009.

SÔNEGO F, ALVES-FILHO JC, CUNHA FQ. Targeting neutrophils in sepsis. **Expert Rev Clin Immunol**. v.10, n.8, p.1019-1028, 2014.

SONG MK, PARK MY, SUNG MK. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. **J Cancer Prev**. v.18, n.4, p.322-329, 2013.

SONIS ST. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**. v.4, n.4, p.277-284, 2004.

SONIS ST, FAY EG. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**. v.16, p.680-86, 2002.

SONIS ST. New thoughts on the initiation of mucositis. **Oral diseases**. v.16, n.7, p.597-600, 2010.

SOUTO FO, ALVES-FILHO JC, TURATO WM, AUXILIADORA-MARTINS M, BASILE-FILHO A, CUNHA FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**. v.183, n.2, p.234-242, 2011.

SOUZA DG, CASSALI GD, POOLE S, TEIXEIRA MM. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br J Pharmacol**. v.134, n.5, p. 985-994, 2001.

STRINGER AM, GIBSON RJ, LOGAN RM, BOWEN JM, YEOH AS, BURNS J, KEEFE DM. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. **Exp Biol Med.** v.232, n.1, p. 96-106, 2007b.

STRINGER AM, GIBSON RJ, BOWEN JM, LOGAN ASHTON K, YEOH ASJ, AL-DASOOQUI N, KEEFE DMK. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Int J Exp Path.** v.90, p.489-499, 2009a.

STRINGER AM. Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis. **Nutrients.** v.5, n.5, p.1488-1499, 2013.

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

TAKASUNA K, HAGIWARA T, HIROHASHI M *et al.* Inhibition of intestinal microflora beta-glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.42, p.280–286, 1998.

TAVARES-MURTA BM, CUNHA FQ, FERREIRA SH. The intravenous administration of tumor necrosis factor alpha, interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol.** v.124,p.1369-1374, 1998.

TREVELIN SC, ALVES-FILHO JC, SÔNEGO F, TURATO W, NASCIMENTO DC, SOUTO FO, CUNHA TM, GAZZINELLI RT, CUNHA FQ. Toll-like receptor 9 activation in neutrophils impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome. **Crit Care Med.** v.40, n.9, p.2631-2637, 2012.

TSUKAHARA Y, MORISAKI T, KOJIMA M, UCHIYAMA A, TANAKA M. iNOS expression by activated neutrophils from patients with sepsis. **ANZ J Surg.** v.71, n.1, p.15-20, 2001.

VINCENT JL, SAKR Y, SPRUNG CL, RANIERI VM, REINHART K, GERLACH H, MORENO R, CARLET J, LE GALL JR, PAYEN D. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. **Crit Care Med.** v.34, n.2, p.344-353, 2006.

XU Y, VILLALONA-CALERO MA. Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. **Annals of oncology.** v.13, n.12, p.1841-1851, 2002.

WALL ME, WANI MC, COOK CE, PALMER KH, MCPHAIL AT, SIM GA. Plant antitumor agents I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J Am Chem Soc.** v.88, p.3888–3890, 1966.

WANG X, ZHU S, QIAN L, GAO J, WU M, GAO J, ZHANG Y, CHAN GL, YU Y, HAN W. IL-1Ra selectively protects intestinal crypt epithelial cells, but not tumor cells, from chemotoxicity via p53-mediated upregulation of p21(WAF1) and p27(KIP1.). **Pharmacol Res.** v.82, p.21-33, 2014.

WANG, J.C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.** v.65, p.635–692, 1996.

WHITE JR, LEE JM, YOUNG PR, HERTZBERG RP, JUREWICZ AJ, CHAIKIN MA, WIDDOWSON K, FOLEY JJ, MARTIN LD, GRISWOLD DE, SARAU HM. Identification of a Potent, Selective Non-peptide CXCR2 Antagonist That Inhibits Interleukin-8-induced Neutrophil Migration. **J Biol Chem.** v.273, n.17, p.10095-10098, 1998.

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

WONG DVT, LIMA-JÚNIOR RCP, CARVALHO CBM, BORGES VF, WANDERLEY CWS, BEM AXC, LEITE CAV, TEIXEIRA MA, BATISTA GLP, SILVA RL, CUNHA TM, BRITO GAC, ALMEIDA PRC, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. The adaptor protein MyD88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **Plos One.** 2015. In press.

ZHU YM, WEBSTER SJ, FLOWER D, WOLL PJ. Interleukin;8/CXCL8 is a Growth Factor for Human Lung Cancer Cells. **Br. J. Cancer**. v.91, p.1970-1976, 2004.

ZLOTNIK A, YOSHIE O. The chemokine superfamily revisited. **Immunity**. v.36, n.5, p.705-716, 2012.