



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

ANIELLE TORRES DE MELO

**EFEITOS DA IMUNOMODULAÇÃO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES DE SEPSE
GRAVE SOBRE AS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS OBSERVADAS NA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

FORTALEZA

2014

ANIELLE TORRES DE MELO

EFEITOS DA IMUNOMODULAÇÃO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES DE SEPSE
GRAVE SOBRE AS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS OBSERVADAS NA MUCOSITE
INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Co-orientador (a): Profa. Dra. Karoline Sabóia Aragão

FORTALEZA

2014

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

-
- M485e Melo, Anielle Torres de.
 Efeitos da imunomodulação em animais sobreviventes de sepse grave sobre as alterações inflamatórias observadas na mucosite intestinal induzida por irinotecano / Anielle Torres de Melo. – 2014.
 88 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2014.
 Área de Concentração: Farmacologia.
 Orientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.
1. Mucosite. 2. Sepse. 3. Imunomodulação. I. Título.

ANIELLE TORRES DE MELO

EFEITOS DA IMUNOMODULAÇÃO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES DE SEPSE
GRAVE SOBRE AS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS OBSERVADAS 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: 07/07/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Lília Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus e à minha Virgem Santíssima, por terem me concedido calma, conforto e serenidade em todas as horas que mais precisei.

Ao meu orientador, Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, por ter depositado em mim sua confiança em realizar este trabalho e ter me passados seus valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Fernando de Queiroz Cunha, por ter me recebido em seu laboratório, pelos grandes ensinamentos e ter tornado possível a realização desse trabalho.

Ao Prof. Roberto César Pereira Lima Júnior, pela disponibilidade em colaborar com o trabalho e pelos seus valiosos conhecimentos.

Ao Prof. Paulo Roberto, Profa. Gerly Brito, Profa. Margarida Pompeu e Profa. Ana Paula Negreiros, por contribuírem para a realização das análises histopatológicas.

À Karoline Sabóia, por ter construído junto comigo cada parte deste trabalho e se mostrar sempre disponível em me ajudar.

Aos colegas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Vanessa Borges, Alexandre Kanashiro, Daniele Nascimento, Maurício, Paula Gisele, e aos técnicos, Kátia dos Santos, Sérgio Rosa e Tadeu Vieira, por me acolherem de forma tão carinhosa e por me ajudarem na execução deste trabalho.

Aos meus pais, Marlúcia Aragão e Francisco Torres, pelo amor incondicional e por serem a razão que me move.

Aos meus amados irmãos, Evelyne Torres, Yannara Torres, George Torres e Rafael Torres por fazerem a minha caminhada se tornar mais leve e feliz.

Às minhas grandes amigas, Kamila Soares e Fernanda Sousa, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado em todos os momentos.

Aos amigos do LAFICA, Eudmar Marcolino, Venúcia Bruna, Lívia Talita, Camila Fernandes, Maraíza Teixeira, Deysi Viviana, Amilcar Dornelas, Ana Paula Santana, Carlos Wagner, Larisse Lucetti, Daniel Gurgel, Carlos Diego e Lethícia. Tenho muito a agradecer à vocês, não tenho dúvidas de que se não fosse pela grande ajuda a mim disponibilizada esse trabalho não teria sido possível.

À Vandinha Pinheiro, pela competência, organização e pela excelente profissional que é.

À todos que direta ou indiretamente participaram da execução deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FUNCAP pelo apoio financeiro.

*“As coisas que queremos e parecerem impossíveis só
podem ser conseguidas com uma teimosia pacífica”*

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é um dos mais comuns tumores malignos atualmente. Regimes à base de irinotecano (IRI) têm sido utilizados no tratamento do CCR e do CCR metastático. Contudo, tais regimes estão associados ao surgimento de mucosite intestinal (MI), muitas vezes limitante do tratamento. A MI e a diarreia grave são efeitos colaterais frequentes que podem atingir de 15-25% dos pacientes em quimioterapia. No entanto, o manejo clínico destes efeitos secundários ainda é parcialmente ineficaz. O estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na resposta imune no estado de pós-sepse vem evidenciando que nesta condição parece haver uma inibição de eventos inflamatórios entre os quais a migração de neutrófilos. Dessa forma, o estado de pós-sepse poderia interferir no curso da MI induzida por IRI. Pretende-se avaliar os efeitos da imunomodulação em animais sobreviventes de sepse grave no desenvolvimento das alterações inflamatórias da MI induzida pelo IRI. Camundongos C57BL/6 machos, 20-25g, foram divididos em 4 grupos (n=5-8), submetidos ao modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) e tratados com eritropoietina 20mg/Kg i.p. 6h depois da CLP e de 12/12h por três dias, para induzir aproximadamente 50% de sobrevivência. Animais submetidos à cirurgia mas não à perfuração do ceco (SHAM) receberam solução salina (Sal, 5 mL/Kg, i.p.). Quinze dias após CLP, os animais sobreviventes e animais do grupo SHAM receberam solução salina (Sal, 5 ml/Kg, i.p.) durante 4 dias ou IRI (75mg/kg, i.p.). A massa corpórea (g) foi mensurada diariamente. No 5° ou 7° dia, foi avaliada a contagem total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e a diarreia (escores). Após a morte, o jejuno e o íleo foram recolhidos para a dosagem da mieloperoxidase (MPO), IL-1 β e IL-10 (pg/mL) e análise histopatológica, ANOVA/Bonferroni ou Kruskal Wallis/Dunn foram usados como testes estatísticos. $P < 0,05$ foi aceito. Protocolo CEPA 84/2014. Animais pós-sépticos por CLP tratados com IRI apresentaram redução dos escores de diarreia e atividade da MPO no 5° e 7° dia (diarreia 5D: [0(0-0)]; 7D: [0(0-2)] / MPO do jejuno e íleo, 5D: $2,96 \pm 1,01$; $2,35 \pm 0,76$ e 7D: $0,42 \pm 0,14$; $0,92 \pm 0,19$, respectivamente) quando comparados com os animais SHAM tratados com IRI (diarreia 5D: 1[0-1]; 7D: [2,5(1-3)] / MPO do jejuno e íleo, 5D: $8,16 \pm 1,48$; $7,96 \pm 0,96$; 7D: $2,51 \pm 0,67$; $2,87 \pm 0,65$, respectivamente). Além disso, animais pós-sépticos tratados com IRI apresentaram redução nos danos histopatológicos no 5° e 7° dia (5D no jejuno e íleo: [1(1-3)] e [1(0-1)]; e 7D no íleo: [2(1-3)] em relação a IRI (5D no jejuno e íleo: [4(2-4)] e [4(1-4)] / 7D: íleo [4(3-4)]) e aumento dos níveis da citocina IL-10 (5D no jejuno e íleo: $55,80 \pm 3,42$; $34,45 \pm 1,87$; 7D: Íleo: $133,00 \pm 20,25$) em comparação com SHAM + IRI (5D no jejuno e íleo: $34,45 \pm 1,87$; $6,91 \pm 3,05$; 7D no íleo: $63,67 \pm 9,08$). No entanto, animais CLP + IRI não tiveram alteração da leucopenia induzida por IRI. Animais C57BL/6 pós-sépticos apresentaram redução da lesão da mucosa intestinal e infiltração de neutrófilos na MI induzida por IRI. Tal efeito pode ser consequente, entre outros, ao aumento de IL-10.

Apoio: CNPq, CAPES, FUNCAP.

Palavras-chave: Irinotecano. Mucosite. Sepse grave. Imunomodulação.

ABSTRACT

Nowadays the colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant tumors. Irinotecan have been used in the treatment of CRC and metastatic CRC. However, the treatment protocols are associated with the development of intestinal mucositis (IM), reaction that affects the therapy. The IM and severe diarrhea are common side effects that may reach 15-25% of the patients undergoing chemotherapy and the clinical management of these effects is still partly ineffective. The study of the mechanisms and mediators involved in immune response in post-sepsis has provided evidences that in this condition seems to be an inhibition of inflammatory events including neutrophil migration. Thus, the post-sepsis could influence the course of MI induced by IRI. The aim of this study is to evaluate the effects of immunomodulation in the development of inflammatory changes of IM induced by Irinotecan in severe sepsis surviving animals. C57BL / 6 male mice, 20-25g, were divided into 4 groups (n = 5-8) were subjected to the model of cecal ligation and puncture (CLP) and treated with ertapenem 20mg/kg i.p. 6 h after CLP and 12/12h for three days to induce approximately 50% of survival. Animals underwent surgery but not to puncture the cecum (SHAM) received saline (NaCl, 5 mL / kg, ip). Fifteen days after CLP, the surviving animals and animals of the SHAM group received saline (NaCl, 5 ml / kg, ip) for 4 days or Irinotecan (75mg/kg, ip). The body mass (g) was measured every day. On the 5th or 7th day, total leukocyte count ($\times 10^3/\mu\text{L}$) and diarrhea (scores) were evaluated. After the death, the jejunum and the ileum were collected for determination of myeloperoxidase (MPO), IL-1 β and IL-10 (pg / ml) and histopathological analysis. ANOVA / Kruskal Wallis test or Bonferroni / Dunn were used as statistical tests. P <0.05 was accepted. CEPA 84/2014 protocol. Post-septic animal by CLP treated with Irinotecan decreased scores of diarrhea and MPO activity in the 5th and 7th day (diarrhea 5D: [0 (0-0)]; 7D: [0 (0-2)] / MPO jejunum and ileum 5D: 2.96 ± 1.08 , 2.35 ± 0.76 and 7D: 0.42 ± 0.14 , 0.92 ± 0.19 , respectively) compared against the SHAM animals treated with Irinotecan (diarrhea 5D: [1(0-1)]; 7D: [2.5 (1-3)] / MPO jejunum and ileum 5D: 8.15 ± 1.48 , 7.96 ± 0.96 ; 7D: 2.51 ± 0.67 , 2.87 ± 0.65 , respectively). Furthermore, post-septic mice treated with Irinotecan decreased histopathological damage in the 5th and 7th day (5D jejunum and ileum: [1(1-3)] and [1(0-1)], and 7D in the ileum: [2 (1-3)] for Irinotecan (jejunum and ileum 5D: [4 (2-4)] and [4 (1-4)] / 7D: ileum [4 (3-4)]) and increased levels of IL-10 (jejunum and ileum 5D: 55.80 ± 3.42 ; 34.45 ± 1.87 ; 7D: Ileum: 133.00 ± 20.25) compared against the SHAM + IRI (5D in jejunum and ileum: 34.45 ± 1.87 ; 6.91 ± 3.05 ; 7D ileum: 63.67 ± 9.08). However, IRI + CLP animals had no change of IRI-induced leukopenia. C57BL/6 post-septic animals had reduced intestinal mucosal injury and neutrophil infiltration in IM induced by Irinotecan, this effect can be consequential, among others, of the increase in IL-10. Support: CNPq, CAPES, FUNCAP.

Keywords: Irinotecan. Mucositis. Severe sepsis. Immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
CARS	Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
CLP	Punção e ligadura do ceco
COX-2	Ciclooxigenase-2
CPT-11	Irinotecano
DMSO	Dimetil Sulfóxido
H&E	Hematoxilina & Eosina
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio
IFN- γ	Interferon $-\gamma$
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-33	Interleucina 33
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88 (<i>Myeloid differentiation factor 88</i>)
NF-$\kappa\beta$	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	<i>Natural killer</i>
IRI	Irinotecano
NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (<i>Nucleotide –binding oligomerization domain</i>)

sIL-1R	Receptor solúvel de IL-1
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotencina (metabólito do Irinotecano)
TLR-4	Receptor <i>Toll like</i> tipo 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TLR-2	Receptor <i>Toll like</i> tipo 2
UGT1A1	Uridina 5'difosfato –glucuronosil-transferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo e representação estrutural do irinotecano e SN-38.....	17
Figura 2 -	Ativação de receptores Toll-like induzem resposta inflamatória na sepse.....	25
Figura 3 -	Resposta imunológica nas diferentes fases da sepse (SIRS e CARS).....	26
Figura 4 -	Experimento piloto de indução da sepse letal por CLP (Protocolo 1).....	37
Figura 5 -	Avaliação da mucosite intestinal no quinto dia em animais previamente submetidos à CLP (Protocolo 2).....	37
Figura 6 -	Avaliação da mucosite intestinal no sétimo dia em animais previamente submetidos à CLP (Protocolo 3).....	37
Figura 7 -	Representação dos graus de diarreia de acordo com escores de intensidade, pós-injeção de Irinotecano em camundongos C57BL/6.....	39
Figura 8 -	Sobrevida de animais após indução da sepse polimicrobiana grave sem tratamento antibiótico.....	44
Figura 9 -	Sobrevida de animais após indução da sepse polimicrobiana grave com tratamento antibiótico.	46
Figura 10 -	Variação ponderal em função do tempo de animais até o quinto dia experimental após a administração de irinotecano.....	48
Figura 11 -	Avaliação dos escores de diarreia no quinto dia experimental após a administração de irinotecano.....	49
Figura 12 -	Irinotecano induz leucopenia em animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano.	50
Figura 13 -	Fotomicrografias do jejuno de animais no quinto dia experimental de mucosite.....	52
Figura 14 -	Fotomicrografias do íleo de animais no quinto dia experimental de mucosite.....	53
Figura 15 -	Dosagem de mieloperoxidase no jejuno e íleo de animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano.....	54
Figura 16 -	Irinotecano aumenta os níveis de IL-1 β no jejuno e íleo de animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano.....	55
Figura 17 -	Irinotecano aumenta os níveis de IL-10 no jejuno e íleo de animais	56

	previamente submetidos à CLP.....	
Figura 18 -	Sobrevida de animais após indução da sepse polimicrobiana grave com tratamento antibiótico (II).....	57
Figura 19 -	Variação ponderal em função do tempo de animais até o sétimo dia experimental após a administração de irinotecano.....	59
Figura 20 -	Avaliação dos escores de diarreia no sétimo dia experimental após a administração de irinotecano.....	59
Figura 21 -	Irinotecano induz leucopenia em animais no sétimo dia experimental após administração de irinotecano.....	60
Figura 22 -	Fotomicrografias do íleo de camundongos no sétimo dia experimental de mucosite intestinal.....	62
Figura 23 -	Dosagem de mieloperoxidase no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental após administração de irinotecano.....	63
Figura 24 -	Efeito da administração de Irinotecano nos níveis de IL-1 β no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental de mucosite intestinal.....	64
Figura 25 -	Efeito da administração de Irinotecano nos níveis de IL-10 no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental de mucosite intestinal.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escores de avaliação da diarreia em camundongos.....	38
Tabela 2 -	Escore de análise histopatológica para intestino delgado.....	40
Tabela 3 -	Avaliação das alterações histopatológicas no jejuno e íleo de animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano.....	51
Tabela 4 -	Avaliação das alterações histopatológicas no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental após administração de irinotecano.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Mucosite intestinal.....	18
1.2	Aspectos Gerais da Sepses.....	22
1.2.1	Fisiopatologia da sepses.....	23
1.2.2	Falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso na sepses.....	27
1.2.3	Mecanismos anti-inflamatórios no estado pós-sepses grave.....	28
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	31
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	Aparelhos e instrumentos laboratoriais.....	33
4.2	Fármacos, soluções e corantes.....	33
4.2.1	Fármacos.....	33
4.2.2	Soluções.....	34
4.2.3	Corantes.....	34
4.3	Animais utilizados nos protocolos experimentais.....	34
4.4	Aspectos éticos.....	35
4.5	Modelos de indução e grupos experimentais.....	35
4.5.1	Modelo experimental de indução de sepses polimicrobiana grave (CLP)	35
4.5.2	Modelo de tratamento com antibiótico.....	35
4.5.3	Indução da mucosite intestinal.....	36
4.5.4	Grupos experimentais.....	36
4.6	Protocolos experimentais.....	37
4.7	Parâmetros avaliados na indução de sepses sem tratamento com antibiótico.....	38
4.7.1	Sobrevida.....	38
4.8	Parâmetros avaliados na mucosite intestinal no quinto e sétimo dia em animais previamente submetidos à CLP.....	38
4.8.1	Avaliação ponderal.....	38

4.8.2	Avaliação do grau de diarreia.....	38
4.8.3	Contagem de leucócitos locais.....	39
4.8.4	Avaliação histopatológica do intestino delgado.....	39
4.8.5	Determinação da infiltração de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase.....	40
4.8.6	Dosagem de citocinas.....	41
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	42
6	RESULTADOS.....	43
6.1	Sobrevida de animais sépticos sem tratamento antibiótico.....	43
6.2	Avaliação dos parâmetros da mucosite intestinal induzida por irinotecano no quinto dia em animais previamente submetidos à CLP e tratados com antibiótico.....	45
6.3	Avaliação dos parâmetros da mucosite intestinal induzida por irinotecano no sétimo dia em animais previamente submetidos à CLP e tratados com antibiótico.....	57
7	DISCUSSÃO.....	65
8	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem como característica o crescimento desordenado de células causado pelo mau funcionamento dos mecanismos bioquímicos de sinalização que dirigem o ciclo celular. Ao longo do tempo as células vão acumulando mutações genéticas não reparadas que levam a transformação carcinogênica, desta forma elas passam a apresentar-se muito agressivas e incontroláveis, podendo formar tumores ou neoplasias malignas. Além disso, essas células alteradas geneticamente são capazes de invadir outros tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para diversas regiões do corpo, fenômeno conhecido como metástase (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013; LEVITZKI; KLEIN, 2010).

A incidência de câncer no mundo, excluindo-se pele não melanoma, é de mais de 14 milhões de casos por ano, sendo 52,7% em homens e 47,3% em mulheres, e a mortalidade chega a 8.201.030 de pessoas. O câncer colorretal é o terceiro com maior incidência no mundo e também a terceira causa de mortes quando comparado a outros tipos de tumores, atingindo 1.360.602 de pessoas e causando 693.881 mortes por ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

No Brasil a estimativa para o ano de 2014 é de que surjam mais de 390.000 novos casos de câncer (excetuando-se pele não melanoma), sendo 52% em homens e 48% entre as mulheres. O câncer de colón e reto é o quarto mais incidente, respondendo por mais de 32.000 casos, sendo 15.070 casos em homens e 17.530 em mulheres. Para esse tipo de câncer, os fatores de risco estão diretamente ligados à alimentação inadequada, ao envelhecimento, histórico da doença em parentes próximos e descontrole do peso. A mortalidade é bastante alta, estima-se cerca de 14.000 mortes por ano no país (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014).

O aumento nas estatísticas de incidência e mortalidade relacionadas ao câncer tem impulsionado as pesquisas em todo o mundo no sentido de se estudar novos fármacos e alvos moleculares da quimioterapia antineoplásica para que se consiga chegar a tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais.

A terapêutica antineoplásica por quimioterapia, forma mais comum de terapia oncológica, é empregada fundamentalmente no tratamento de tumores não curáveis por cirurgia ou por radioterapia. A quimioterapia também é utilizada naqueles casos em que se deseja reduzir a dimensão e a agressividade de cirurgias oncológicas através de um tratamento

pré-operatório (quimioterapia neoadjuvante) ou após um tratamento principal, como por exemplo, a cirurgia, para diminuir a incidência de disseminação a distância de células neoplásicas (quimioterapia adjuvante).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, preservando as células normais. Entretanto, a maioria dos agentes antineoplásicos atua de forma não específica, lesando tanto as células neoplásicas, quanto às células normais. Tal abordagem terapêutica embora possa aumentar em alguns casos as taxas de sobrevida, acarretam impacto em termos de qualidade de vida, encargos econômicos e sociais, principalmente devidos a seus efeitos colaterais.

No momento em que células normais são comprometidas, estas substâncias podem provocar efeitos tóxicos graves (CALABRESI; CHABNER, 2003). Dentre os efeitos colaterais relacionados ao uso de antineoplásicos, destacam-se náusea, vômitos, diarreia, mielossupressão, alopecia, cardiotoxicidade, cistite hemorrágica, esteatohepatite, mucosite oral, mucosite intestinal, dentre outros (COSTA *et al.*, 2013; LEITÃO *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2008). No entanto, existem poucas abordagens de como prevenir e controlar esses sintomas (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999).

Um dos sistemas mais afetados pela quimioterapia do câncer é o gastrointestinal (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999). Em relação à mucosite intestinal, vários autores demonstraram o aparecimento dessa patologia após o uso de metotrexato (LEITÃO *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2011a; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004a; GIBSON *et al.*, 2002), 5-fluorouracil (5-FU) (SOARES *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2011b; SOARES *et al.*, 2008; SONIS *et al.*, 2004), ciclofosfamida (XIANG *et al.*, 2011; WOO *et al.*, 2000); gencitabina (APOSTOLIDOU *et al.*, 2003), capecitabina (PISANO *et al.*, 2009; BOEHMER; JAEGER 2002) e mucosite intestinal induzida por irinotecano (IRI) (ALIMONTI *et al.*, 2004; GIBSON *et al.*, 2003; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; LOGAN *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2008; WONG, 2013). Recentemente, nosso laboratório LAFICA – (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer) desenvolveu um modelo experimental de mucosite intestinal induzida pela associação de 5-FU e IRI em camundongos C57BL/6. Neste trabalho, foi observados alterações dos parâmetros histopatológicos e na participação de mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-6) (PEREIRA, 2013).

Por mais de três décadas o tratamento de pacientes com câncer colorretal avançado baseava-se na utilização do quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), no entanto, os resultados obtidos mostravam-se insatisfatórios (GUICHARD *et al.*, 1998). A partir de então novos esquemas quimioterápicos passaram a ser utilizados. Saltz (2000) demonstrou que a

combinação de 5-FU com irinotecano (IRI) apresentou taxas de resposta de aproximadamente 55% com uma sobrevida de 22 meses. Ainda nesse contexto, estudos clínicos com o antineoplásico irinotecano demonstraram efeitos adversos toleráveis e um largo espectro de eficácia contra tumores sólidos. De especial interesse foi a demonstração de considerável atividade contra o câncer colorretal 5-FU-refratário, levando a um programa de avaliação abrangente de irinotecano como agente único e como parte de terapias combinadas. Os resultados destes estudos estabeleceram o irinotecano como uma das mais ativas drogas de primeira e segunda linha de tratamento de câncer colorretal (BLEIBERG, 1999; O'LEARY; MUGGIA, 1998; ROTHENBERG, 1997; VAN CUTSEM *et al.*, 1997).

O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina, um alcalóide natural isolado da madeira e casca da árvore chinesa *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). Wall *et al.* (1966) isolaram a camptotecina durante os anos 60, sendo o irinotecano introduzido na clínica no final de 1980.

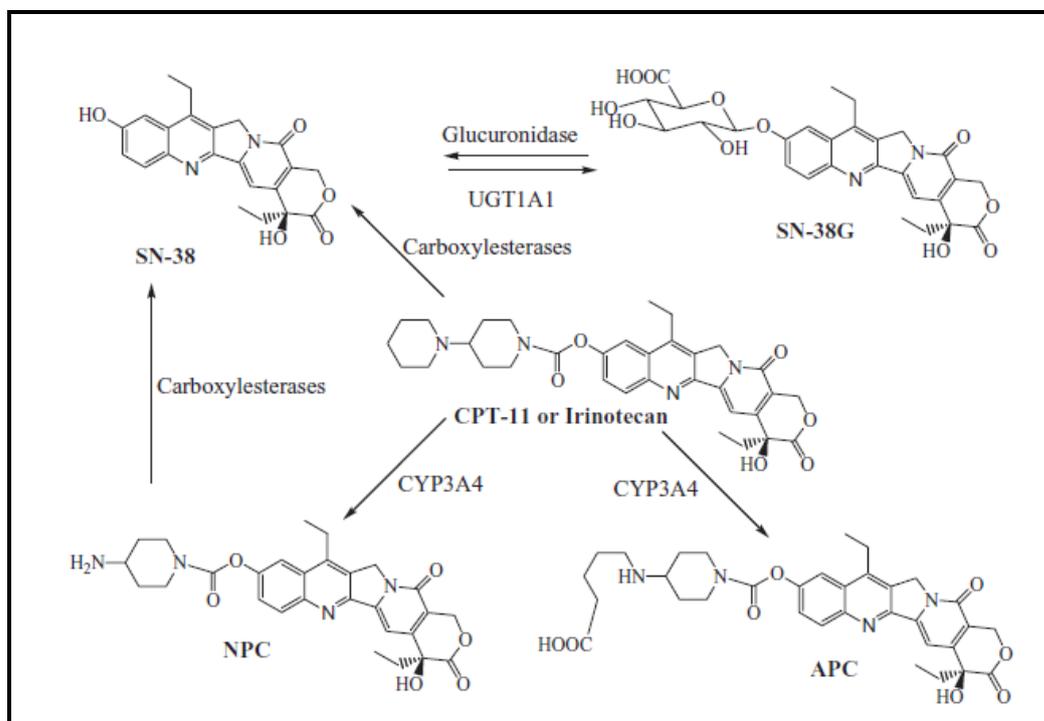
A Topoisomerase I é uma enzima que altera e modifica a topologia da cadeia dupla do DNA sem alterar a sequência de unidades estruturais deste, ou seja, os nucleotídeos. Sua função é essencial durante a fase de replicação e transcrição do DNA e é realizada através de quebras transitórias em uma das cadeias de dupla fita, 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 fita de DNA religada normalmente, permitindo a continuação da replicação e facilitando a função de outras enzimas, tais como DNA e RNA polimerases. O irinotecano tem como alvo a topoisomerase I e atua estabilizando o intermediário covalente topoisomerase I – DNA, desta forma causa uma quebra irreversível na cadeia de DNA e impede a sua duplicação. A topoisomerase I parece ser expressa em todas as células, mesmo aquelas que não se dividem, no entanto, os níveis da enzima são mais elevados em tecidos com câncer, principalmente em tumores de órgãos como cólon, próstata, ovário, esôfago e cérebro em comparação com os tecidos normais adjacentes. Este fato torna a topoisomerase I um alvo atraente para a quimioterapia do câncer (CHAMPOUX, 2001; WANG, 1996).

O irinotecano é um pró-fármaco que exige a clivagem pela enzima carboxilesterase da cadeia lateral dipiperidino na posição 10 para formar metabolito com maior atividade citotóxica, o 7-etil-10-hidroxi-camptotecina (SN-38). O metabolito SN - 38 é 1000 vezes mais potente em inibir a topoisomerase I do que o irinotecano (KAWATO *et al.*, 1991).

Nos seres humanos, elevados níveis de atividade da carboxilesterase são encontrados em microssomas do fígado, embora quantidades menores de atividade enzimática também

sejam encontradas em outros tecidos, tais como a mucosa gastrointestinal e em células de tumor. O SN-38 é metabolizado pela enzima UDP-glucuronosiltransferase 1A1 (UGT1A1) para forma inativa SN-38 glicuronídeo (SN-38-Glu), que é excretada no lúmen gastrointestinal por via biliar. Acredita-se que as bactérias intestinais produzem β -glucuronidase, que hidrolisa SN-38-Glu para a forma ativa SN-38, danificando células do epitélio intestinal e provocando lesão da mucosa (KEHRER *et al.*, 2001; TAKASUNA *et al.*, 1996) (Figura 1).

Figura 1: Metabolismo e representação estrutural do irinotecano e SN-38



Fonte: Mullangi *et al.* (2010).

Os principais efeitos tóxicos observados com o irinotecano são síndrome colinérgica aguda, neutropenia, diarreia de início tardio, náuseas e vômitos, fadiga e alopecia. Os efeitos tóxicos mais severos e que limitam o uso do irinotecano são a mielossupressão (principalmente neutropenia) e a diarreia tardia (ALIMONTI *et al.*, 2004; ARBUCK, 2001; SALIBA *et al.*, 1998; TAKIMOTO, 1998).

A neutropenia de grau 3 ou 4 ocorre em 23% a 44% dos pacientes, é reversível, não cumulativa, e de curta duração. Apesar de alta incidência, 23% (ENZINGER *et al.*, 2005) a 44% dos pacientes (ROSATI *et al.*, 2002), pode ser facilmente tratada com a administração de G-CSF (fator estimulante da colônia de granulócitos) (ALIMONTI *et al.*, 2004).

Dois tipos de diarreia são associados com o uso do irinotecano: diarreia aguda ou precoce e diarreia crônica ou tardia (RUBEINSTEIN *et al.*, 2004). O primeiro tipo, de curso geralmente leve, ocorre durante ou logo após administração do irinotecano pelo aumento da atividade colinérgica, pois o irinotecano inibe acetilcolinesterase (AChE) (DODDS; RIVORY, 1999; DODDS *et al.*, 2001; GANDIA *et al.*, 1993). O segundo, de início tardio, possui alta incidência, em torno de 82% (SALIBA *et al.*, 1998), e, quando grave, pode limitar a eficácia do tratamento, já que muitas vezes é necessário reduzir sua dose ou até mesmo suspender a administração da droga (ALIMONTI *et al.*, 2004; DUNCAN; GRANT, 2003; IKEGAMI *et al.*, 2002). Estes efeitos colaterais descritos como a diarreia associada à mucosite intestinal são de grande importância, pois podem determinar desde a redução dos novos esquemas antineoplásicos até levar à cessação desta terapia levando prejuízo na eficácia do tratamento oncológico (BLEIBERG; CVITKOVIC, 1996; SALTZ *et al.*, 2000).

1.1 Mucosite intestinal

Muitos tipos de tumores podem ser tratados com quimioterapia e radioterapia, no entanto, esses tratamentos tem uma toxicidade dose limitante. Embora o tratamento quimioterápico tenha como alvo células neoplásicas de rápida divisão celular, inevitavelmente pode atingir células progenitoras saudáveis do organismo, que compartilham da mesma característica, resultando em disfunção. O epitélio do trato alimentar é, em particular, afetado negativamente (SONIS, 1998, 2004; SYMONDS, 1998).

Mucosite alimentar ou gastrintestinal 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) (GIBSON; KEEFE, 2006). Esta síndrome caracteriza-se por ulceração da mucosa do trato digestivo, podendo resultar em dor intensa, disfagia, diarreia, cólicas, náuseas, disfunção e hemorragia, dependendo do tecido afetado. Um dos principais problemas relacionado ao tratamento com irinotecano é a diarreia grave que limita a dose de administração. Uma síndrome colinérgica precoce e imprevisível tem sido relatada em mais de 80% dos pacientes logo após receber terapia com irinotecano ou até mesmo durante a administração e parece ser causada pela inibição da atividade da colinesterase pelo irinotecano, podendo ser controlada pela administração de atropina. A síndrome colinérgica aguda transitória grave pode ocorrer em 9% dos pacientes, os sintomas incluem além de

diarreia, diaforese, calafrios, mal-estar, tonturas, distúrbios visuais, lacrimejamento, salivação, bradicardia e cólicas abdominais (VANHOEFER *et al.*, 2001).

A fase tardia da diarreia ocorre em 87 % dos casos, destes, 16% tem sintomas graves necessitando de internação hospitalar. Normalmente os sintomas desta fase se iniciam 7-10 dias após o início do tratamento quimioterápico, sendo esta a toxicidade limitante da dose de irinotecano, que pode ser fatal quando associado com neutropenia, outro efeito colateral frequente. O tratamento de suporte com altas doses de loperamida pode substancialmente reduzir a incidência de diarreia grave de cerca de 30 % para menos de 10%, tornando possível o aumento de dose deste quimioterápico (ABIGERGES *et al.*, 1994). A ingestão de alimentos e líquidos pode ser prejudicada, a capacidade reduzida de absorver os nutrientes e o indivíduo pode ter um aumento de susceptibilidade às infecções (HERRSTEDT, 2000; JANSMAN *et al.*, 2001).

O progresso da mucosite envolve quatro fases: (I) o influxo de células inflamatórias para a lâmina própria bem antes das alterações no número de células epiteliais serem evidentes; (II) perda de células epiteliais e da estrutura da mucosa; (III) ablação de áreas de epitélio e (IV) cura da mucosa. Esta sequência completa de eventos pode não ocorrer em todos os casos, e é dependente dos protocolos terapêuticos utilizados. Na fase inicial, a quimioterapia ou a radioterapia desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias e um influxo de células inflamatórias para a submucosa, interferindo na integridade epitelial (DUNCAN; GRANT, 2003).

Na segunda fase, ocorre a perda de células progenitoras entre outras por apoptose, como resultado do dano ao DNA e outros componentes celulares, isto induz a restituição epitelial e colapso da estrutura. Em situações extremas, este evento pode conduzir à desnudação de grandes áreas do epitélio, perda completa da estrutura e ulceração. Nesta fase, patógenos oportunistas podem colonizar e invadir o tecido, provocando assim maiores respostas inflamatórias. A mucosite é, portanto, uma doença multi-fatorial. Além disso, embora a maioria dos seus efeitos sejam manifestados na camada epitelial, é evidente que alterações dentro da submucosa têm um impacto importante sobre a natureza e gravidade da mucosite e na subsequente recuperação (DUNCAN; GRANT, 2003) .

Há mais de 10 anos o grupo LAFICA vem se dedicando ao estudo da toxicidade da quimioterapia do Câncer em especial a mucosite intestinal induzida por quimioterápicos.

No que diz respeito à mucosite intestinal, foi primeiramente demonstrado por Carneiro-Filho *et al.* (2004a) que o antineoplásico metrotexato foi capaz de causar grandes mudanças na função do intestino delgado por perturbar a permeabilidade intestinal e a indução da

secreção de eletrólitos em paralelo com danos histológicos significativos e que este antineoplásico retarda o esvaziamento gástrico e o trânsito gastrointestinal de líquidos em ratos acordados (SOARES *et al.*, 2011a).

Foi demonstrado também que a glutamina, e especialmente a alanil glutamina, têm efeitos expressivos na proteção da mucosa intestinal contra a agressão por 5-Fluorouracil (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004b) e que este quimioterápico é capaz de induzir dismotilidade gastrointestinal através do estudo das variações funcionais decorrentes do tratamento quimioterápico (SOARES *et al.*, 2008) e que o fator de ativação de plaquetas (PAF) está envolvido na mucosite induzida por este agente (SOARES *et al.*, 2011b). Recentemente, evidenciou-se que a citocina IL-4 participa como uma citocina pró-inflamatória na mucosite induzida por 5-fluorouracil, sugerindo que o antagonista de IL-4 pode ser um novo alvo terapêutico para esta condição (SOARES *et al.*, 2013).

Melo *et al.* (2008) demonstraram que o irinotecano é capaz de provocar diarreia grave, perda acentuada de massa corpórea, leucopenia e aumento da mortalidade em camundongos. A avaliação histopatológica do tecido intestinal evidenciou um extenso infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria de duodeno, perda da arquitetura das criptas e achatamento dos vilos. A participação de citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas também foram estudados, ficando demonstrado um aumento das citocinas TNF- α , IL-1 β e KC (quimiocina análoga da IL-8 de humanos), e da expressão de iNOS e COX-2 no intestino. A Pentoxifilina e Talidomida (inibidores da síntese e liberação de citocinas) mostraram-se eficazes em reverter parte dos efeitos observados.

No intuito de aprofundar os estudos em relação à participação de TNF- α na mucosite intestinal, o pré-tratamento com anticorpo monoclonal anti-TNF- α foi proposto. Para tanto, o Infliximab foi utilizado em administração única antes da indução da mucosite, e este apresentou uma inibição nos parâmetros inflamatórios estudados, tais como atividade de mieloperoxidase, nível tecidual de IL-1 β e expressão de iNOS, sem, contudo proteger contra as alterações funcionais e parâmetro de sobrevida (FIGUEIREDO, 2011).

Em estudo recente, foi demonstrado o papel da via caspase-1/IL-18 como parte do processo desencadeador de mucosite intestinal associado ao irinotecano. A progressão dos danos no duodeno de animais foi inibida através da utilização de animais *knockout* para IL-18 e da modulação farmacológica com IL-18bp (proteína ligante da IL-18), administrada imediatamente antes da primeira injeção de irinotecano, as quais se mostraram capazes de impedir a progressão da mucosite intestinal relacionada ao irinotecano por prevenir alterações na morfologia da mucosa, nos parâmetros inflamatórios (atividade de MPO), diarreia,

disfunção intestinal, além de uma melhora em termos de sobrevivência. A deleção de genes para IL-18 e administração de IL-18bp foram criticamente envolvidas na redução da atividade da iNOS, enquanto a imunopressão iNOS foi marcadamente aumentada em animais tratados com irinotecano e reduzida em camundongos knockout para IL-18 (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

Analisados em conjunto, estes resultados confirmam a IL-18 como um importante regulador da ativação de iNOS. Ficou evidenciado, ainda, que macrófagos na lâmina própria constituem-se como fonte de IL-18 durante a mucosite intestinal. Parte das alterações relacionadas à administração de irinotecano foram prevenidas ao se utilizar animais *knockout* para caspase-1, sendo observadas preservação da arquitetura, reduzida infiltração de neutrófilos, atividade de iNOS e dismotilidade. Neste estudo, a IL-18 mostrou-se uma citocina reguladora chave no contexto da mucosite intestinal por irinotecano, confirmando-se como um importante regulador da síntese de NO (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014).

O papel da IL-33 foi estudado por Lima-Júnior (2008), onde camundongos que receberam irinotecano e foram pré-tratados com IL-33 demonstraram menor atividade inflamatória, diarreia e contratilidade intestinal, provavelmente por essa citocina atuar promovendo um fenótipo Th2 anti-inflamatório. Contrário a esse estudo, utilizando doses diferentes de irinotecano, Guabiraba *et al.* (2013) mostraram que a IL-33 medeia a mucosite intestinal induzida por irinotecano, onde a mucosite intestinal foi marcadamente reduzida em animais deficientes para IL-33R (ST2^{-/-}). Além disso, a IL-33 recombinante exacerbou a mucosite intestinal induzida por irinotecano, ao passo que o bloqueio com o anticorpo anti-IL-33 ou ST2 solúvel apresentou uma atenuação da doença.

Mais recentemente, um estudo demonstrou que o irinotecano é capaz de induzir um significativo dano sobre o trato gastrointestinal, que se correlacionou diretamente com as alterações funcionais, detectadas pelo teste de permeabilidade e de perfusão intestinal de açúcares e íons, onde se evidencia uma redução da excreção de lactulose e um aumento da secreção intestinal de sódio, potássio e cloreto (WONG, 2013).

Outro parâmetro avaliado foi o aumento de bactérias no sangue e translocação de bacilos gram-negativos (*Escherichia coli*) para órgãos periféricos e estéreis como fígado e linfonodo mesentérico no curso das alterações causadas pelo irinotecano, além de diminuição na temperatura retal de camundongos, achados esses semelhantes aos encontrados no contexto da septicemia. Houve prevenção do dano intestinal e da diarreia quando se utiliza deleção gênica para o receptor Toll-like do tipo 2 e proteína adaptadora MyD88 (envolvida na sinalização de receptores Toll), sugerindo um importante papel da flora bacteriana na

mucosite intestinal. Contudo, a deleção gênica do receptor intracelular NOD-1 causou melhora apenas no parâmetro da diarreia (WONG, 2013).

Os tratamentos clínicos atualmente disponíveis não são capazes de prevenir a mucosite, mas podem limitar a sua gravidade e duração, principalmente se usados em combinação. Várias estratégias, incluindo analgesia, tratamento com antibióticos e nutrição parenteral total são usados para neutralizar os efeitos adversos da mucosite em pacientes. No entanto, a modulação do regime de tratamento (uso de doses mais baixas ou intervalos de recuperação longos entre as doses) continua a ser o meio mais eficaz para limitar a incidência e gravidade real (FILICKO *et al.*, 2003).

1.2 Aspectos Gerais da Sepsé

O termo sepsé é definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) decorrente de infecção principalmente por bactérias, embora também possa ser consequência de infecção por fungos, vírus e protozoários (HOTCHKISS *et al.*, 2003; RIEDEMANN *et al.*, 2003). Esta resposta se manifesta por duas ou mais das seguintes condições: 1) hipertermia (temperatura maior que 38°C) ou hipotermia (temperatura menor que 36°C); 2) taquicardia (frequência cardíaca maior que 90 batimentos por min); 3) taquipnéia (frequência respiratória maior que 20 respirações por min ou PaCO₂ menor que 32 mmHg); 4) contagem dos leucócitos totais no sangue maior que 12.000/mm³ ou menor que 4.000/mm³, ou mais de 10% de formas imaturas (bastões) (BONE *et al.*, 1992).

A pneumonia é a causa mais comum, respondendo por cerca de metade de todos os casos, seguido por infecções intra-abdominais e do trato urinário. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* são os microorganismos gram-positivos isolados mais comuns, enquanto *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas aeruginosa* predominam entre os isolados gram-negativos. Em um estudo envolvendo 14.000 pacientes de UTI em 75 países, bactérias gram-negativas foram isoladas em 62% de pacientes com sepsé grave que tiveram hemoculturas positivas, bactérias gram-positivas em 47% e fungos em 19% (VICENT *et al.*, 2009).

O termo "sepsé grave" foi proposto para descrever casos em que a sepsé é complicada por disfunção orgânica aguda, como hipotensão, hipoxemia, oligúria, acidose metabólica, trombocitopenia ou obnubilação e o termo "choque séptico" como sendo uma sepsé complicada por hipotensão refratária à reposição volêmica (ANGUS; VAN DER POLL, 2013). Esta hipotensão acentuada acarreta má perfusão tecidual que, juntamente com o

intenso infiltrado inflamatório em órgãos alvos leva à disfunção dos mesmos com consequente morte do indivíduo (DAVIES *et al.*, 1997; HOTCHKISS *et al.*, 2003).

A incidência de sepse tem aumentado, sendo considerada a principal causa de morte em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), superando até mesmo doenças cardiovasculares (OSUCHOWSKI *et al.*, 2006). Acredita-se que o aumento na incidência desta patologia seja devido ao crescente número de pacientes imunodeprimidos, ao uso frequente de procedimentos invasivos, à frequência no uso de antibióticos (geração de microrganismos resistentes), além do aumento da expectativa de vida (RANGEL-FRAUSTO, 2005).

Anualmente, em todo o mundo, ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepse grave (RICTTIRSCH *et al.*, 2007). Na Europa, 35% dos pacientes internados em UTI's apresentam quadro séptico em algum momento de sua estadia, sendo que 27% morrem de sepse, valor este que aumenta para 50% em pacientes com choque séptico (VINCENT *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, estima-se que a cada ano, cerca de 750.000 hospitalizações, 570.000 ocorrências em emergências e 215.000 mortes sejam atribuídas à sepse (JEAN-BAPTISTE *et al.*, 2007).

No Brasil, entre os pacientes internados em UTI's de hospitais públicos, a taxa de mortalidade relacionada à sepse chega a 32,8%, a 49,9% quando ocorre sepse grave e 72,7% quando ocorre o choque séptico, sugerindo que a sepse é um grande problema de saúde pública em UTI's no país (KAUSS *et al.*, 2010). Dados do estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) também demonstraram que a sepse é a doença que gera maiores custos aos setores públicos e privados (SILVA *et al.*, 2004).

Apesar dos grandes avanços na compreensão da fisiopatologia da doença, pouco se avançou em relação ao seu tratamento. São mais de 20 anos de extensas pesquisas e desenvolvimento de numerosas terapêuticas usadas em ensaios clínicos, porém os índices epidemiológicos continuam piorando.

1.2.1 Fisiopatologia da Sepse

O processo inflamatório é a resposta inicial do hospedeiro que ocorre quando um tecido íntegro sofre algum tipo de agressão, seja invasão microbiana, trauma físico ou queimadura. Quando a resposta inflamatória sobrepuja os mecanismos normais disponíveis de proteção do hospedeiro, ela se torna a causa da lesão tecidual. É o que ocorre na sepse, que embora a ativação do sistema imune durante uma invasão microbiana seja geralmente

protetora, esta doença se desenvolve em um grande número de pacientes como consequência de uma resposta imune excessiva ou mal regulada (BONE, 1997).

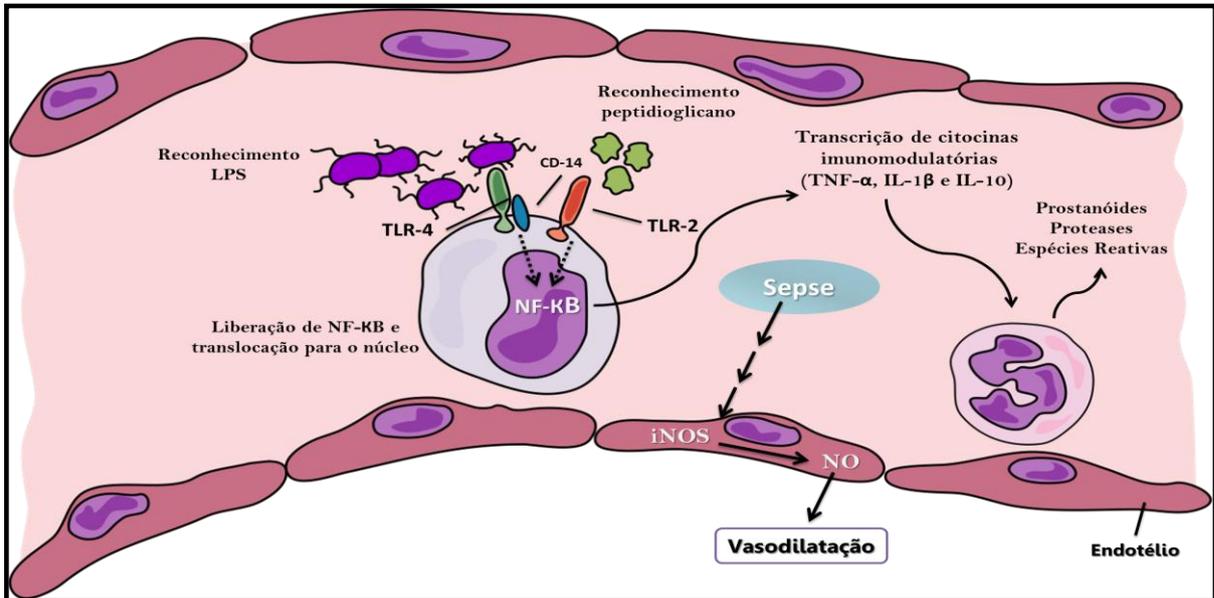
A sepse inicia uma resposta inflamatória rápida que, direta e indiretamente, provoca lesão tecidual generalizada. Bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus e fungos expressam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são reconhecidos por receptores Toll-like (TLRs). Estes funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes na superfície de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (RUSSEL, 2006).

O peptidoglicano de bactérias gram-positivas e o lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas são reconhecidos pelo TLR-2 (Toll-like 2) e TLR-4 (Toll-like 4), respectivamente. A ativação de TLR-2 e TLR-4 ativam a via intracelular de transdução de sinal que leva à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que move-se do citoplasma para o núcleo, promovendo a transcrição de citocinas, tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10) (RUSSEL, 2006).

Além disso, a sepse aumenta a atividade da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), aumentando a síntese de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador. As citocinas ativam as células endoteliais que expressam moléculas de adesão e causam dano à estas por ativar células como neutrófilos, monócitos, macrófagos e plaquetas. Estas células efetoras ativadas podem libertar mediadores, tais como proteases, espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas e leucotrienos, que causam danos às células endoteliais, conduzindo a um aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. As citocinas também ativam a cascata de coagulação, alterando o equilíbrio pro/anticoagulante (RUSSEL, 2006) (Figura 2).

O mecanismo que leva ao combate da infecção por neutrófilos também é responsável por causar danos ao endotélio através da liberação de mediadores (como enzimas proteolíticas e metabólitos de oxigênio) que aumentam permeabilidade vascular com consequente edema nos pulmões e outros tecidos. As células endoteliais ativadas liberam óxido nítrico, um potente vasodilatador que age como mediador de choque séptico (FUJISHIMA; AIKAWA, 1995).

Figura 2 - Ativação de receptores Toll-like induzem resposta inflamatória na sepse.



Fonte: Adaptado de Russel (2006).

TLR-4: Receptor Toll-like 4. TLR-2: Receptor Toll-like 2. NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B. CD-14: Cluster of differentiation 14. TNF-α: Fator de necrose tumoral α. IL-1β: Interleucina 1β. IL-10: Interleucina 10. iNOS: Óxido nítrico sintase induzida. NO: Óxido nítrico.

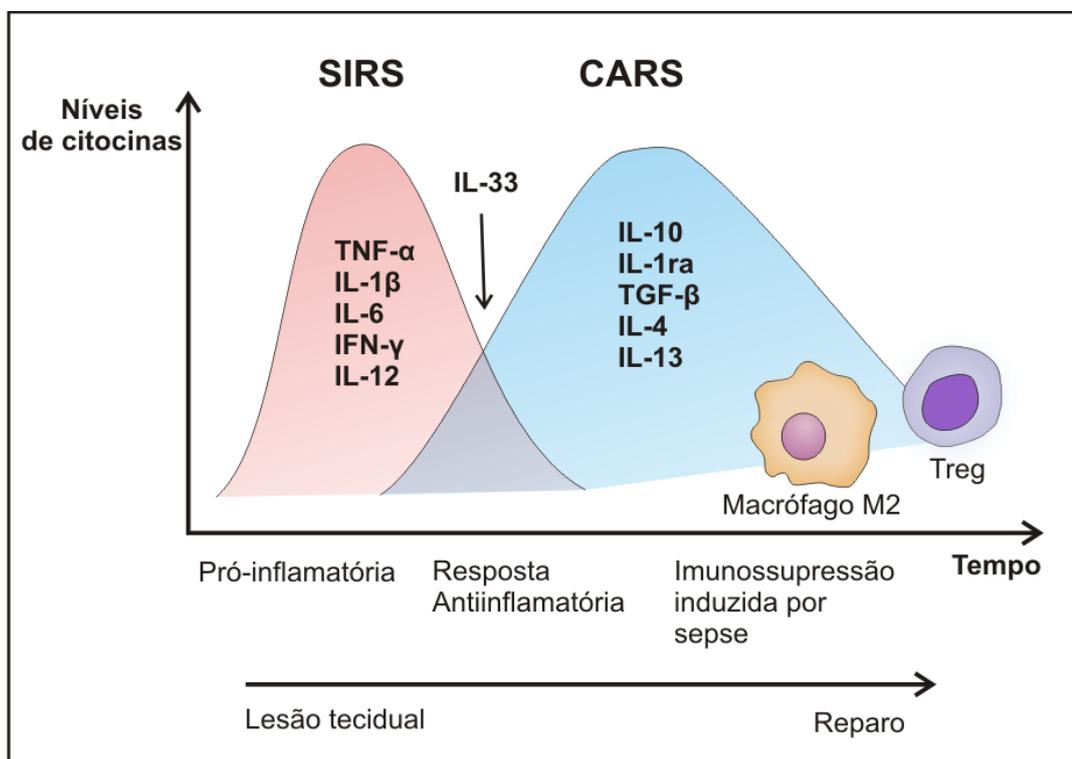
Em relação à coagulação, evidencia-se um aumento dos fatores pró-coagulantes e diminuição de fatores anticoagulantes. Os lipopolissacarídeos estimulam as células endoteliais para supra regularem o fator tecidual, ativando a cascata de coagulação. O fibrinogênio é em seguida, convertido em fibrina, o que leva à formação de trombos microvasculares. Em contrapartida, a sepse reduz os níveis de proteína C, proteína S, antitrombina III e inibidor da via fator tecidual, que são fatores anticoagulantes. Em acréscimo, diminui a síntese de trombomodulina e do receptor endotelial de proteína C, prejudicando a sua ativação e aumenta a síntese do inibidor do ativador plasminogênio tecidual, prejudicando, assim, a fibrinólise (LIAW *et al.*, 2004).

Os microorganismos estimulam a resposta imune humoral e adaptativa mediada por células. Nesse contexto, células B são responsáveis por liberar imunoglobulinas que promovem o reconhecimento de microorganismos por fagócitos e células NK (*natural killers*). A sepse pode alterar o subgrupo de células T presentes, variando de um perfil Th1 ou Th2, onde há a secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias respectivamente, que varia de acordo com o organismo, a carga infectante dentre outros fatores. Ressalta-se que

alguns pacientes evoluem para o óbito precocemente em decorrência de uma reação inflamatória sistêmica intensa (SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011).

Citocinas anti-inflamatórias, tais como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-11 e IL-13, são igualmente produzidas no contexto da sepse, desta forma possibilitam o desenvolvimento de anergia e alentecimento da resposta aos agentes etiológicos, contexto típico de imunossupressão denominada síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (CARS) (HOTCHKISS; KARL, 2003) (Figura 3).

Figura 3 - Resposta imunológica nas diferentes fases da sepse (SIRS e CARS).



Fonte: Adaptado de (ALVES-FILHO *et al.*, 2010; NASCIMENTO *et al.*, 2010).

É complexa a regulação do equilíbrio pró/anti-inflamatório, podendo-se chegar a uma situação de intensa “dissonância imunológica”, denominada MARS, na qual ocorrem SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) e CARS (síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória) no mesmo paciente e, conforme estas considerações, propõe-se que o balanço entre mediadores pró/anti-inflamatórios seria a chave explicativa para a evolução dos quadros de sepse (DOI *et al.*, 2009; SIQUEIRA-BATISTA *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2009).

1.2.2 Falência da migração de neutrófilos para o foco infeccioso na sepse.

Entre os leucócitos, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o foco infeccioso, sendo extremamente importantes para o controle local do crescimento bacteriano e consequente prevenção da disseminação da infecção. Várias evidências têm demonstrado o papel fundamental do neutrófilo no controle do processo infeccioso e na progressão da sepse. Verdrengh *et al.* (1997), assim como Nakamura *et al.* (2001) demonstraram que animais depletados de neutrófilos apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *Staphylococcus aureus*, apresentando sinais graves de sepse e aumento do índice de mortalidade. Confirmando a importância da migração de neutrófilos para o sítio infeccioso, estudos têm demonstrado através de diversos modelos experimentais, tais como ligação e perfuração do ceco (CLP) e administração intraperitoneal de *Staphylococcus aureus*, uma correlação positiva entre a falência da migração de neutrófilos, bacteremia, aumento dos níveis séricos de citocinas e redução da sobrevivência dos animais (BENJAMIM *et al.*, 2000; CROSSARA-ALBERTO *et al.*, 2002; TAVARES-MURTA *et al.*, 2001).

Os mecanismos envolvidos na falência da migração de neutrófilos durante a sepse grave parece ser decorrente da liberação excessiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias na circulação, as quais induzem a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), com consequente aumento da produção de óxido nítrico (NO). Este dado é suportado por estudos prévios que demonstraram que a administração endovenosa de TNF- α e IL-8 promove uma redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e que as concentrações circulantes das citocinas estão aumentadas nos animais submetidos à sepse grave, quando comparados com animais submetidos à sepse não grave (BENJAMIM *et al.*, 2002; CROSSARA-ALBERTO *et al.*, 2002; TAVARES-MURTA *et al.*, 1998). Além disso, a falência da migração de neutrófilos na sepse grave ou aquela inibida pela administração sistêmica de citocinas é revertida pelo tratamento dos animais com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS (BENJAMIM *et al.*, 2000). É importante ressaltar que o tratamento dos animais com altas doses de inibidor específico da iNOS ou o uso de camundongos deficientes para iNOS também promove reversão da falência da migração, contudo verifica-se redução da atividade microbicida desses neutrófilos, permitindo a disseminação bacteriana (BENJAMIM *et al.*, 2002; BENJAMIM *et al.*, 2000).

O conjunto de resultados descritos na literatura até o presente momento sugere que o reconhecimento dos microrganismos por fagócitos, ou de seus produtos, induz a síntese e

liberação sistêmica de citocinas com resultante produção de NO. Este NO liberado é responsável pela falência da migração de neutrófilos observada durante a sepse grave (BENJAMIM *et al.*, 2002; BENJAMIM *et al.*, 2000).

Benjamim *et al.* (2002) desenvolveram dois modelos experimentais de sepse com diferentes graus de severidade, a sepse sub-letal (SL-CLP) e sepse letal (L-CLP) induzida pela ligadura e punção do ceco (CLP). A sepse letal induzida por CLP resultou em uma falência da migração de neutrófilos para o local da infecção e alta mortalidade dos camundongos C57BL/6.

Alves-Filho *et al.* (2010) demonstraram ser o receptor de quimiocina CXCR2 crucial para o recrutamento de neutrófilos da circulação para o sítio infeccioso. Nesse estudo foi determinado que a ativação de receptores Toll-like em neutrófilos seria responsável pela *down-regulation* da expressão desses receptores, e que a IL-33 impede a regulação negativa de CXCR2 e inibição da quimiotaxia induzida pela ativação receptores TLR-4. Além disso, os autores mostraram que o mecanismo pelo qual a citocina IL-33 regula a expressão de CXCR2 é dependente da inibição da expressão do receptor quinase-2 acoplado à proteína G (GRK-2), proteína que induz a internalização do receptor. Esses dados mostram o papel da IL-33 como um potencial novo tratamento para pacientes com sepse.

1.2.3 Mecanismos anti-inflamatórios no estado pós-sepse grave

A sepse grave pode levar o indivíduo à morte rapidamente ou desencadear um processo de imunossupressão. Numerosos estudos sugeriram que os pacientes que sobrevivem à alta hospitalar após a sepse permanecem em risco aumentado de morte pelos próximos meses em até 8 anos (PERL *et al.*, 1995). Além disso, Niskanen (1996) foi o primeiro a analisar a sobrevivência de pacientes pós sepse grave a longo prazo, tendo demonstrado através de uma curva de sobrevivência que pacientes que passaram pela UTI são mais propensos a morrer em um período de até 5 anos em comparação com pacientes internados em geral. Aqueles que sobrevivem muitas vezes têm o funcionamento físico ou cognitivo prejudicados, transtornos do humor e uma baixa qualidade de vida associado a uma maior susceptibilidade de desenvolver doenças, tais como pneumonia, câncer e doenças cardíacas. (ANGUS, 2003; PERL *et al.*, 1995). Weycher *et al.* (2003) demonstraram que a mortalidade e os custos econômicos são extremamente elevados em pacientes com sepse grave tanto durante o período de doença aguda como posteriormente, onde a porcentagem de mortalidade nesse

estudo ultrapassou 50% em um ano e mais de 70% em cinco anos após o período agudo da doença.

A resposta inflamatória inicial resultante da sepse dá lugar a uma subsequente "resposta anti-inflamatória compensatória", contudo, tornou-se evidente que a infecção provoca uma resposta mais complexa, variável e prolongada, em que mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios podem contribuir tanto para a resolução da infecção e recuperação do tecido quanto para o desenvolvimento de lesões em órgãos e infecções secundárias (VAN DER POLL; OPAL, 2008).

O sistema imunológico envolve mecanismos humorais e celulares que atenuam os potenciais efeitos nocivos da resposta pró-inflamatória inicial resultante da sepse (VAN DER POLL; OPAL, 2008). Macrófagos e células dendríticas apresentam um fenótipo anti-inflamatório, que promove reparação tecidual, e as células T reguladoras supressoras reduzem a inflamação (ANDRESSON; TRACEY, 2012).

A produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em sepse tem sido amplamente estudadas. Citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL -1 α e IL - 1 β , IL - 12 , IFN- γ e IL-6) são necessárias para iniciar um processo inflamatório eficaz contra a infecção, enquanto que o sua produção em excesso tem sido associada com a disfunção de múltiplos órgãos, sistemas e aumento da mortalidade (PARRILLO *et al.*, 1990; PINSKY *et al.*, 1993; BLACKWELL; CHRISTMAN, 1996). Em contraste, citocinas anti-inflamatórias tais como IL - 10, IL - 13, IL - 4, TGF- β , IL - 1ra, ou receptores solúveis de IL-1(sIL -1R) parecem ser um pré-requisito para o controle e regulação negativa da resposta inflamatória, que conduz a uma depressão do sistema imunológico e estão aumentadas de forma significativa na circulação de pacientes com sepse (FRIEDMAN *et al.*, 1997; HOTCHKISS; KARL, 2003; MARCHANT *et al.*, 1995; PRUITT *et al.*, 1996; VAN ZEE *et al.*, 1992).

Estudos de Nascimento *et al.* (2010) demonstraram um perfil semelhante aos citados anteriormente. Camundongos sobreviventes de sepse polimicrobiana grave foram inoculados com a bactéria *Legionella pneumophila*, que tem como característica causar uma infecção não letal em animais hígidos. Aqueles animais que sobreviveram à sepse grave e foram infectados com a bactéria apresentaram uma mortalidade absoluta, sugerindo que em animais que sobrevivem à sepse grave há um quadro de alentecimento da resposta imune. A teoria de um possível estado de imunossupressão foi investigada avaliando-se a subpopulação de células T reguladoras, as quais mostraram-se expressas no timo e baço dos animais no período pós sepse. Além disso, a capacidade proliferativa de células T esplênicas encontrava-se suprimida,

sugerindo que estas células T reguladoras presentes em um período pós sepse poderiam ser as responsáveis pela imunomodulação.

Diversos tem sido os trabalhos abordados pelo referido grupo de pesquisa no que concerne a mucosite intestinal experimental onde a mucosite intestinal induzida por irinotecano tem sido descrita como uma síndrome em que uma inflamação acentuada acomete o tecido intestinal, com aumento de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células polimorfonucleares e mononucleares, causando perda de integridade da barreira epitelial e consequente translocação de bactérias para a corrente sanguínea e outros órgãos. Além disso, são evidenciadas diarreia grave e dismotilidade intestinal, o que leva à acentuada perda de peso e consequente morte. O manejo clínico destes efeitos secundários ainda é parcialmente ineficaz. Assim como na mucosite intestinal, na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) ocorre a liberação sistêmica de diversos mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas nos pacientes sépticos e em animais em modelos dessa patologia. Após uma primeira fase de resposta imune excessiva ou mal regulada, estabelece-se um quadro de imunossupressão, com mudança no perfil de resposta imune através do envolvimento de mediadores anti-inflamatórios. Devido a esses fatores, a imunomodulação advinda da sepse mostra-se como uma ferramenta útil de reprogramação imunológica para o estudo de eventos inflamatórios da mucosite intestinal pela quimioterapia do câncer por irinotecano.

Nesse contexto, o presente estudo propõe investigar se o estado pós-sepse grave poderia interferir no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano, avaliando o papel de citocinas anti-inflamatórias e outras vias implicadas nesse processo.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A terapia antineoplásica atua reduzindo a população de células tumorais e reduzindo sua capacidade de proliferação e invasão tecidual, no entanto, os esquemas terapêuticos disponíveis ainda causam importantes efeitos colaterais, algumas vezes requerendo descontinuidade do tratamento, reduções de doses de fármacos utilizados em quimioterapia e modificações na seleção de agentes antineoplásicos e do esquema posológico (AZEVEDO, 2010; SONIS, 2004).

A literatura mostra que a mucosite intestinal associada à diarreia é um grave efeito tóxico do irinotecano que pode levar à desidratação, à má-absorção dos nutrientes e consequentemente à deterioração do estado geral do paciente (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS, 2004; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006). O tratamento da mucosite pode requerer a hospitalização do paciente, bem como sua nutrição parenteral total, com consequente aumento de custos, podendo ainda provocar atraso ou redução da administração do tratamento quimioterápico, interferindo na eficácia do tratamento do câncer.

Apesar do impacto das manifestações clínicas e dos avanços na descoberta de alguns mecanismos fisiopatológicos e moleculares responsáveis pelo curso da mucosite intestinal, ainda não se estabeleceu um protocolo padrão eficaz para a prevenção e controle da diarreia (ALIMONTI *et al.*, 2004; GIBSON *et al.*, 2002; GIBSON; KEEFE, 2006).

Assim como na mucosite intestinal, na SRIS ocorre a liberação sistêmica de diversos mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis pela maioria das alterações fisiopatológicas observadas nos pacientes sépticos e em animais em modelos dessa patologia. Após uma primeira etapa de resposta imune excessiva ou mal regulada, estabelece-se um quadro de imunossupressão, com mudança no perfil de resposta imune através do envolvimento de mediadores anti-inflamatórios, mudança no perfil de ação de células fagocitárias entre outros. Devido a esses fatores, a chamada imunossupressão advinda da sepse mostra-se como uma ferramenta útil de reprogramação imunológica para o estudo de eventos inflamatórios da mucosite intestinal pela quimioterapia do câncer por irinotecano.

O estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na resposta imune no estado de pós-sepse vem evidenciando que nesta condição parece haver uma inibição de eventos inflamatórios entre os quais a migração de neutrófilos. Dessa forma, parece razoável supor que o estado de pós-sepse possa de alguma forma interferir no curso da mucosite intestinal que se segue à utilização de agentes antitumorais, como o irinotecano. Nessa perspectiva que este estudo foi delineado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação os efeitos da imunomodulação em animais sobreviventes de sepse grave sobre as alterações inflamatórias observadas na mucosite intestinal induzida por irinotecano

3.2 Objetivos específicos

- Induzir um estado de imunomodulação em animais através da cirurgia de sepse grave (CLP), sendo avaliado o êxito do método através da análise da sobrevivência;
- Avaliar em animais sobreviventes da sepse grave (CLP) as alterações nos parâmetros da fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por irinotecano no quinto e sétimo dia experimental;
- Estudar as possíveis alterações dos mediadores pró-inflamatórios envolvidos na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano no quinto e sétimo dia experimental, como a citocina IL-1 β , bem como possíveis alterações dos mediadores anti-inflamatórios envolvidos no estado de imunossupressão como IL-10;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Agitador Vortex – Cetomart MV
- Autoclave
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AI200
- Contador Automático de Células – Colter
- Fluxo Laminar
- Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas - ELISA ELX800, Biotek
- Freezer -80°C, Thermo Scientific
- 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
- 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
- Tubos de Falcon 15 e 50 mL

4.2 Fármacos, soluções e corantes

4.2.1 Fármacos

- Cloridrato de Irinotecano (Evoterin®, ampolas 5mL, 100mg/mL, Evolabis)
- Ertapenem sódico (Invanz®, frasco-ampola 1g, Merck Sharp & Dohme).
- Cloridrato de Xilazina 2% (Kensol®, frasco-ampola 10mL)

- Cloridrato de Quetamina 10% (Agener®, Frasco -ampola 10mL)
- Tribromoetanol 2,5%

4.2.2 Soluções

- Água destilada
- Água Mili-Q
- Álcool 70%
- Formol tamponado 10%
- Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 100% (Merck)
- Peróxido de Hidrogênio 30% (Sigma)
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%)
- Tampão fosfato de potássio
- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)
- O-dianisidina (Sigma)
- Iodopovidona 1%
- Salina tamponada com fosfato (PBS)
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%).

4.2.3 Corantes

- Hematoxilina (Merck)
- Eosina (Merck)

4.3 Animais utilizados nos protocolos experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com peso entre 20-25g procedentes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão- Preto (FMRP-USP).

Os animais permaneceram em gaiolas apropriadas, em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade $55\pm 10\%$) com fornecimento *ad libitum* de ração e água.

4.4 Aspectos éticos

Os protocolos desenvolvidos foram de acordo com os Padrões de Uso de Animais de Laboratório da UFC. A pesquisa foi previamente submetida à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará e aprovado de acordo com o protocolo CEPA nº 84/2014.

4.5 Modelos de indução e grupos experimentais

4.5.1 Modelo experimental de indução de sepse polimicrobiana grave (CLP).

Para mimetizar o quadro de sepse polimicrobiana grave, utilizamos o modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) originalmente descrito por Baker *et al.* (1983) com algumas modificações. Para o procedimento cirúrgico, inicialmente, os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de ketamina 10% associado a cloridrato de xilazina 2% nas doses de 115 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente, por via intraperitoneal (i.p.). Após o procedimento anestésico, foi feita uma tricotomia e assepsia utilizando-se iodopovidona 1%, em cada animal foi feita uma incisão mediana de aproximadamente 1 cm no abdome, o ceco foi localizado e completamente exposto. Abaixo da válvula ileocecal foi feita uma ligadura não obstrutiva e, a seguir, o ceco foi perfurado uma única vez de maneira transfixante, com agulha 18 G. Após a perfuração, o ceco foi levemente pressionado para assegurar a saída do conteúdo intestinal e recolocado na cavidade abdominal. Após a sutura da musculatura e da pele, os animais receberam por via subcutânea (s.c.) 1 mL de solução salina estéril para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia (1 a 2h). Os animais SHAM-operados (controles) foram submetidos ao mesmo procedimento, porém sem perfurações.

Inicialmente, realizou-se um experimento piloto de cirurgia de CLP para avaliar a indução e reprodutibilidade do modelo experimental, através de uma curva de sobrevivência dos animais comparados ao grupo SHAM.

4.5.2 Modelo de tratamento com antibiótico

Para impedir a mortalidade de 100% observada em modelos experimentais de sepse grave (BENJAMIM *et al.*, 2003), os animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração do ceco (CLP) foram tratados, por via intraperitoneal (i.p.) com o antibiótico Ertapenem sódico

na dose de 20mg/Kg de acordo com o descrito por Nascimento (2010), administrados em 6 h, e posteriormente em intervalos de 12 h até o 3º dia após a cirurgia de CLP. Os animais operados foram acompanhados por 15 dias após a cirurgia.

4.5.3 Indução da mucosite intestinal

A mucosite intestinal foi induzida de acordo com o protocolo desenvolvido por Ikuno *et al.* (1995) e adaptado por Melo *et al.* (2008) e Lima-Júnior *et al.* (2012) para as condições experimentais do laboratório. Os animais receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de irinotecano (Evoterin[®] - Evolabis), na dose de 75 mg/kg, ou salina (5mL/kg), uma injeção por dia por quatro dias e avaliados no 5º e 7º dia após a primeira administração.

4.5.4 Grupos experimentais

Os animais C57BL/6 foram divididos em grupos.

Grupo SHAM: Animais submetidos ao procedimento cirúrgico, mas não à perfuração do ceco (SHAM) e tratados com salina (NaCl 0,9%, i.p.) (n=8);

Grupo CLP: Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de perfuração do ceco e tratados com Ertapenem 20mg/Kg (CLP) e com salina (NaCl 0,9%, i.p.)(n=15);

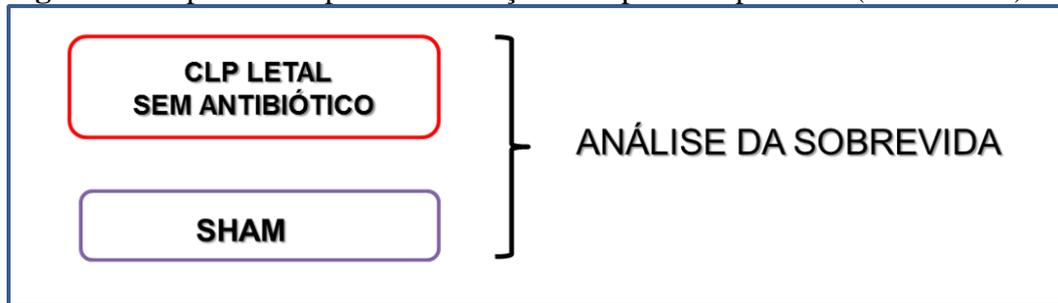
Grupo SHAM+IRI: Animais submetidos ao procedimento cirúrgico, mas não à perfuração do ceco (SHAM) e tratados com irinotecano (75 mg/kg, i.p.)(n=8).

Grupo CLP+IRI: Animais submetidos ao procedimento cirúrgico de perfuração do ceco e tratados com Ertapenem 20mg/Kg (CLP) e com irinotecano (75 mg/kg, i.p.)(n=15).

Grupo ERTAPENEM+IRI: Animais submetidos ao procedimento cirúrgico mas não à perfuração do ceco (SHAM) e tratados com Ertapenem 20mg/Kg e com irinotecano (75 mg/kg, i.p.)(n=8).

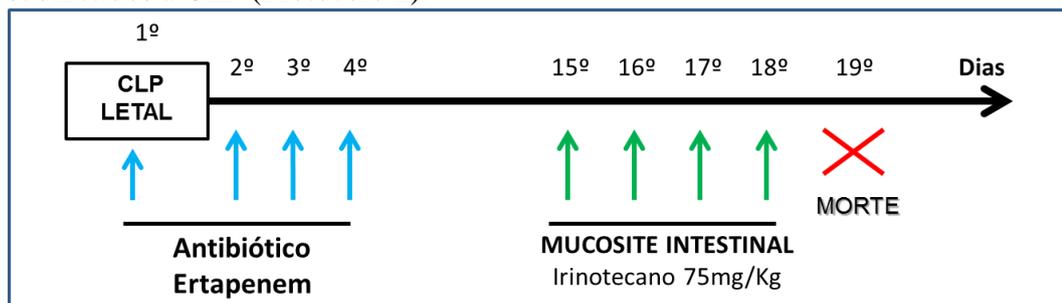
4.6 Protocolos experimentais

Figura 4 - Experimento piloto de indução da sepse letal por CLP (Protocolo 1).



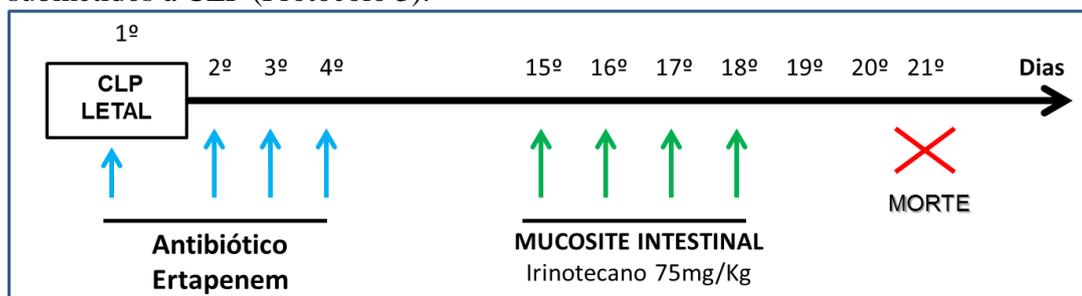
Camundongos C57BL/6 foram submetidos à cirurgia de CLP (ligadura e punção do ceco) para indução de sepse polimicrobiana grave sem posterior tratamento com o antibiótico Ertapenem. Um grupo controle (SHAM) passou pelo mesmo procedimento cirúrgico, mas sem perfuração do ceco. Os animais foram acompanhados diariamente até que houvesse 100% de mortalidade.

Figura 5 - Avaliação da mucosite intestinal no quinto dia em animais previamente submetidos à CLP (Protocolo 2).



Camundongos C57BL/6 foram submetidos à cirurgia de CLP (ligadura e punção do ceco) para indução de sepse polimicrobiana grave com posterior tratamento com o antibiótico Ertapenem. Após 15 dias os animais sobreviventes da sepse receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de Irinotecano, na dose de 75 mg/kg, ou salina (5 mL/kg), uma injeção por dia e avaliados no 5º dia da mucosite após a primeira administração do antineoplásico (LIMA-JÚNIOR *et al*, 2010).

Figura 6 - Avaliação da mucosite intestinal no sétimo dia em animais previamente submetidos à CLP (Protocolo 3).



Camundongos C57BL/6 foram submetidos à cirurgia de CLP (ligadura e punção do ceco) para indução de sepse polimicrobiana grave com posterior tratamento com o antibiótico Ertapenem. Após 15 dias os animais sobreviventes da sepse receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de Irinotecano, na dose de 75 mg/kg, ou salina (5 mL/kg), uma injeção por dia e avaliados no 7º dia da mucosite após a primeira administração do antineoplásico (WONG, 2013).

4.7 Parâmetros avaliados na indução de sepse sem tratamento com antibiótico.

4.7.1 Sobrevida

A sobrevida dos animais após a cirurgia de CLP foi avaliada através da observação diária dos animais até que houvesse 100% de mortalidade. Posteriormente os dados foram plotados em tabelas e gráficos.

4.8 Parâmetros avaliados na mucosite intestinal no quinto e sétimo dia em animais previamente submetidos à CLP

4.8.1 Avaliação ponderal

A massa corpórea dos animais foi medida em gramas (g) diariamente desde o início da indução da mucosite até o dia da morte (quinto e sétimo dia). Os valores encontrados foram expressos em % de variação da massa corpórea, em relação à massa inicial e plotados em uma curva ponderal. O 100% é o valor do peso inicial do animal mensurado no primeiro dia de experimento.

4.8.2 Avaliação do grau de diarreia

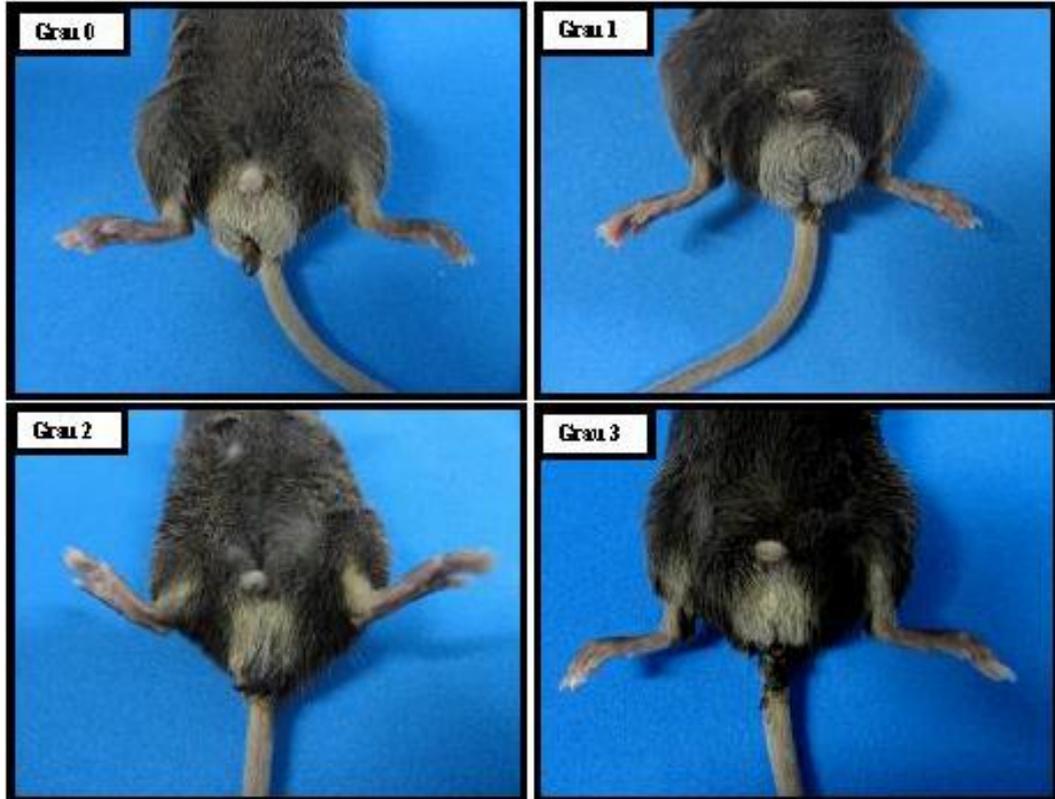
Aos eventos de diarreia, apresentados no quinto e sétimo dia após o início do tratamento dos animais com Irinotecano, foram atribuídos escores (segundo proposta de Kurita *et al.*, (2000), como discutido no **Tabela 1**. Esse parâmetro representou um indicativo de indução da mucosite, tendo em vista a associação do sinal diarreia à mucosite, observada na prática clínica (**Figura 7**).

Tabela 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).

Figura 7 - Representação dos graus de diarreia de acordo com escores de intensidade, pós-injeção de 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.

4.8.3 Contagem de leucócitos totais

O número total de leucócitos plasmáticos foi determinado para verificar o efeito do irinotecano na indução da leucopenia. Os animais foram levemente anestesiados com tribromoetanol para coleta do sangue do plexo retro-orbital, e em seguida foi realizada a contagem de leucócitos totais no contador automático de células (Coulter Ac.T). Os resultados foram expressos como número de células $\times 10^3/\mu\text{L}$ de sangue. Essa observação serviu como controle do efeito imunossupressor do irinotecano sobre o animal.

4.8.4 Avaliação histopatológica do intestino delgado

Após a morte dos animais por deslocamento cervical, foi removido um segmento de 1,0 cm de cada porção do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) do camundongo. A seguir,

as amostras foram fixadas em formol tamponado 10% e processadas para coloração pelo método H&E (Hematoxilina-Eosina).

A análise histopatológica do intestino delgado envolveu a observação do aspecto dos vilos e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório (microscopia óptica 400x). O grau de mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores proposto por Woo *et al.* (2000), descrito no **Tabela 2**.

Tabela 2 - Escore de análise histopatológica para intestino delgado.

Escore	Análise Histopatológica
Escore 0	Ausência de lesão
Escore 1	Menos de 10% das criptas contém células necróticas
Escore 2	Mais de 10% das criptas contém células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta.
Escore 3	Mais de 10% das criptas contém células necróticas com perda da arquitetura das criptas (<20%), os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes
Escore 4	Semelhante a 3, entretanto, é mais extensa com perda da arquitetura das criptas e encurtamento dos vilos

Fonte: Woo *et al.* (2000)

4.8.5 Determinação da infiltração de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO), uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Para sua determinação pelo método colorimétrico ELISA, uma porção do jejuno e íleo foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de tecido por mL, homogeneizada e centrifugada (1500 g /15 min a 4°C). Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante (placas de 96 poços), 200µL da solução de leitura (5mg O-dianisidine; 15µL H₂O₂ 1%; 3mL tampão fosfato; 27mL H₂O) foram adicionados e lidos a 460nm (t₀=0min e t₁=1min). A mudança na absorbância obtida foi plotada em curva padrão de mieloperoxidase e expressa em termos de atividade de MPO (U/mg de tecido) (BRADLEY *et al.*, 1982).

4.8.6 Dosagem de citocinas

No 5º e 7º dia após a primeira injeção de irinotecano, amostras do intestino foram retiradas de cada animal para dosagem de citocinas e estocadas em freezer -70°C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção de IL-1 β e IL-10 foram determinadas por método ELISA. Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpos anti IL-1 β e anti IL-10 murinos (2 μ g/mL). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a temperatura de 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpos monoclonais biotinizados anti IL-1 β e anti IL-10 diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 μ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foi adicionado. O reagente de cor 0-phenylenediamine (OPD, 50 μ L) foi adicionado 15min depois e as placas incubadas no escuro a 37°C por 15 a 20min. A reação enzimática foi parada com H₂SO₄ e a absorbância medida a 490nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism[®], versão 6.0 e os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (Erro padrão da média), para as variáveis com distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal.

A análise estatística entre os grupos realizou-se empregando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não paramétricos, baseando-se na continuidade das variáveis em análise, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

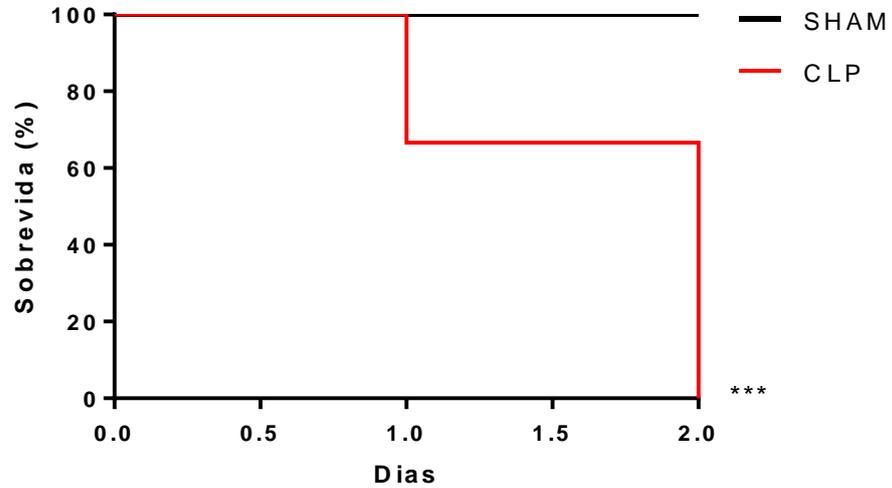
6 RESULTADOS

6.1 Sobrevida de animais sépticos sem tratamento antibiótico

Com o intuito de mimetizar o que ocorre em termos fisiopatológicos em pacientes sépticos graves foi realizado um modelo de sepse polimicrobiana grave (CLP letal) caracterizado por induzir 100 % de mortalidade em animais (**Protocolo 1**). Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual evolui para um quadro de sepse e choque séptico.

Os animais sépticos não tratados com antibiótico apresentaram letargia, piloereção, secreção ocular, diarreia, taquipnéia e taquicardia, com 100% de mortalidade ao fim do segundo dia após a CLP, característicos do quadro de sepse, aspectos revistos por (ALVES-FILHO *et al.*, 2006). Os animais submetidos à cirurgia mas não à perfuração do ceco (SHAM) tiveram uma sobrevida de 100%, sendo significativamente diferentes do grupo CLP ($P < 0,001$) (**Figura 8**).

Figura 8 - Sobrevida de animais após indução da sepse polimicrobiana grave sem tratamento antibiótico.

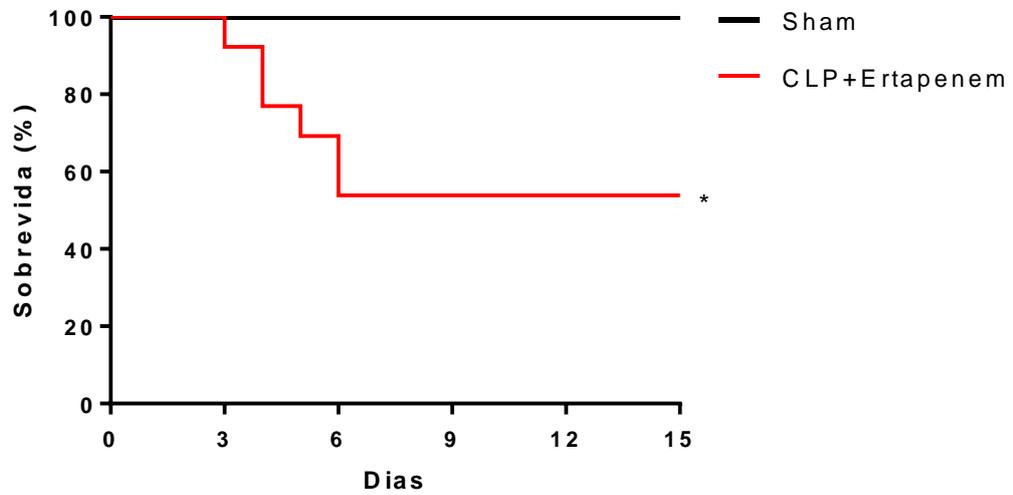


A sobrevida dos animais controles e submetidos à sepse grave sem tratamento de antibiótico foi determinada diariamente até 100% de mortalidade. Os animais submetidos à CLP receberam uma perfuração transfixante com agulha 18G. Os animais SHAM não tiveram perfurações no ceco. Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de seis a sete animais por grupo. As taxas de mortalidade foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de Log-rank. *** $P < 0,001$ vs grupo Sham.

6.2 Avaliação dos parâmetros da mucosite intestinal induzida por irinotecano no quinto dia em animais previamente submetidos à CLP e tratados com antibiótico.

Inicialmente, o protocolo de cirurgia de CLP foi seguido com o intuito de induzir sepse polimicrobiana em camundongos, contudo, havia a necessidade de que os animais sobrevivessem à esse episódio para que pudessem chegar ao momento posterior ao quadro de inflamação sistêmica. Para tanto, seguiu-se com a utilização do antibiótico de largo espectro Ertapenem na dose de 20mg/Kg como descrito por Nascimento (2008). A primeira administração desse antibiótico foi feita 6 h após a cirurgia de CLP, e foi mantido em intervalos regulares de 12 h durante 3 dias. Dentro de 6 h após a sepse os animais já estavam com a maioria dos sinais da resposta sistêmica (letargia, piloereção, secreção ocular, diarreia, taquipnéia e taquicardia), os quais foram menos intensos após o tratamento com antibiótico (CLP-Ertapenem) quando comparados com os dados anteriores de animais sépticos sem tratamento antibiótico. A taxa de sobrevida também foi diferente, sendo de 0% no grupo CLP após dois dias e aumentada para 53% quando administrado o antibiótico Ertapenem, permitindo que parte dos animais sobrevivessem (**Figuras 8 e 9**). Em relação ao grupo controle Sham houve redução significativa da sobrevida de animais previamente submetidos à CLP+ Ertapenem, de 100% para aproximadamente 53% ($P < 0,05$) (**Figura 9**).

Figura 9 - Sobrevida de animais após indução da sepse polimicrobiana grave com tratamento antibiótico.



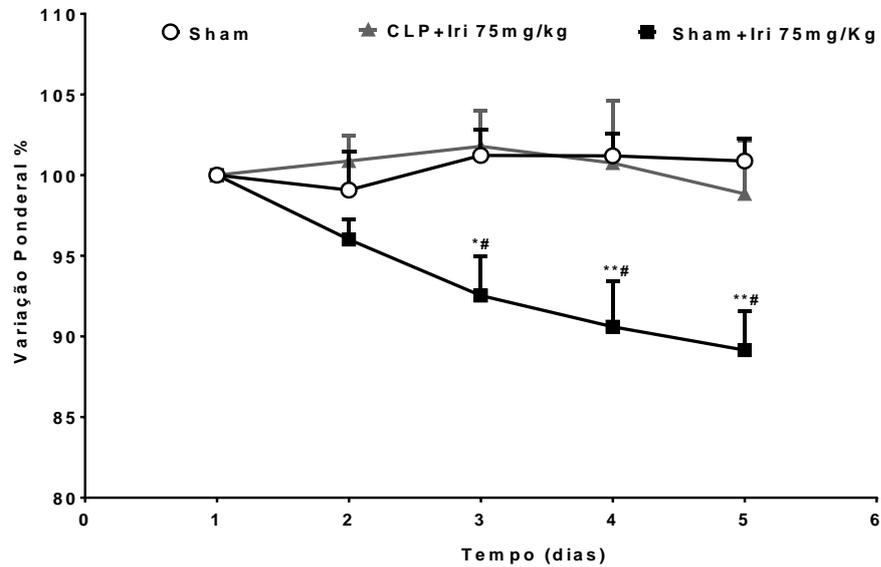
A sobrevida dos animais controles e submetidos à sepse grave com tratamento de antibiótico foi determinada diariamente por um período de 15 dias. Os animais submetidos à CLP receberam uma perfuração transfixante com a agulha 18G. Na 6^o h após a cirurgia, os animais sépticos foram tratados com antibiótico Ertapenem sódico (20mg/ Kg), e a administração mantida em intervalos de 12h, durante 3 dias. Os SHAM operados não tiveram perfurações no ceco e receberam solução salina (5mL/kg, i.p.). Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de sete a oito animais por grupo. As taxas de mortalidade foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de Log-rank. *P<0,005 vs grupo Sham.

Com o intuito de estudar as alterações na fisiopatologia da mucosite intestinal no período de imunossupressão, os animais sobreviventes da sepse grave tratados com o antibiótico Ertapenem foram mantidos sob observação por 15 dias, período após o qual se mostraram recuperados dos sinais e sintomas característicos da sepse. No 15º dia iniciou-se a indução de mucosite intestinal por irinotecano.

Para a indução da mucosite intestinal por irinotecano utilizou-se o modelo previamente estabelecido e utilizado nos estudos de Melo (2007), Lima-Júnior (2008) e Wong (2013), nos quais se administra irinotecano 75mg/Kg por quatro dias consecutivos. A morte dos animais e coleta de amostras deram-se no quinto dia experimental (**Protocolo 2**).

A **figura 10** mostra a variação de massa corpórea avaliada diariamente do primeiro dia de indução da mucosite intestinal até o quinto dia. Os animais do grupo Sham (controle negativo) e do grupo CLP Mucosite não demonstraram perda de massa corpórea significativa em relação à medição do primeiro dia experimental e nem diferenças entre si ($P > 0,05$). Contudo, o grupo Sham Mucosite (controle positivo) teve uma redução gradativa de massa corpórea a partir do terceiro dia que manteve-se até o quinto dia experimental. Quando comparados com o grupo Sham mucosite, o grupo Sham teve uma diferença de 11,6% ($P < 0,01$), já o grupo CLP Mucosite teve uma diferença de 9,6% ($P < 0,05$).

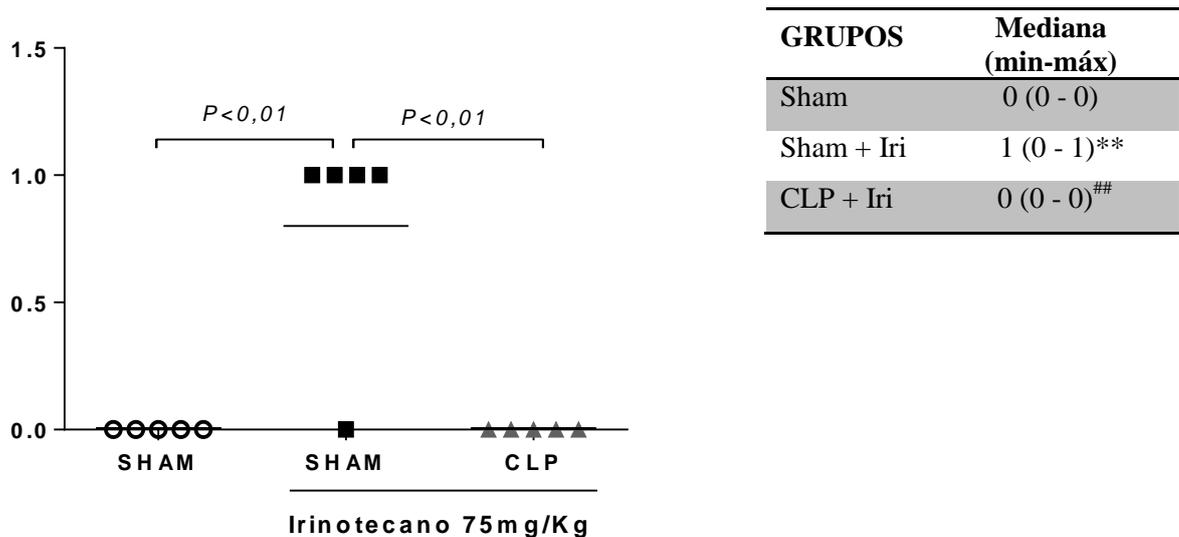
Figura 10 - Variação ponderal em função do tempo de animais até o quinto dia experimental após a administração de irinotecano.



A avaliação ponderal dos animais (n=5) foi mensurada diariamente por todo o período experimental de mucosite intestinal. Os animais sobreviventes da CLP letal e o grupo Sham não apresentaram variação ponderal significativa. O grupo Sham mucosite apresentou perda ponderal significativa em relação aos grupos CLP mucosite e Sham. Os pontos representam média \pm EPM da variação percentual de massa corpórea, calculada através das diferenças das massas corpóreas obtidas diariamente e a massa inicial. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA/Bonferroni $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ vs sham, $^{\#}p < 0,05$ vs CLP mucosite.

Os escores propostos por Kurita *et al.* (2000) foram utilizados para avaliar a gravidade da diarreia causada por irinotecano. No grupo controle positivo (Sham Mucosite) houve indução de uma diarreia leve no quinto dia [1(0-1)], caracterizada por fezes levemente alteradas, pouco umedecidas, que foi diferente significativamente dos grupos Sham e CLP Mucosite, que apresentaram grau zero de diarreia [0(0-0)] ($P < 0,01$) (**Figura 11**).

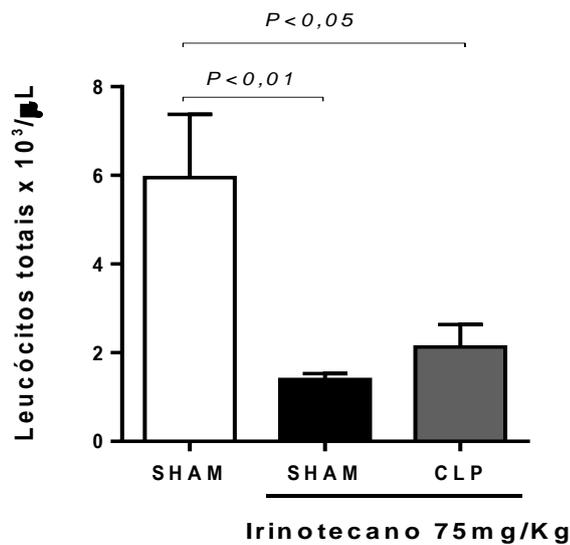
Figura 11. Avaliação dos escores de diarreia no quinto dia experimental após a administração de irinotecano



Os animais sobreviventes da CLP receberam irinotecano 75mg/kg e Sham receberam irinotecano 75mg/kg ou salina (5 mL/kg, i.p.) durante 4 dias. Os escores de diarreia foram analisados no quinto dia (n=5). Os animais do grupo CLP mucosite apresentaram diarreia leve, que foi estatisticamente diferente daquela apresentada nos demais grupos. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). ** $P < 0,01$ vs grupo sham, ## $P < 0,01$ vs grupo sham mucosite.

A avaliação da citotoxicidade do quimioterápico foi feita através da contagem de leucócitos totais no sangue periférico dos animais. A coleta de sangue realizada no quinto dia experimental evidenciou uma acentuada diminuição na contagem de leucócitos principalmente no grupo Sham mucosite (76,5%), mas também no grupo CLP Mucosite (64,2%) quando comparados ao controle Sham ($P < 0,05$) (**Figura 12**).

Figura 12 - Irinotecano induz leucopenia em animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano



Animais tratados com irinotecano (75mg/kg, i.p.) apresentaram significativa leucopenia no quinto dia experimental tanto no grupo Sham Mucosite quanto no grupo CLP Mucosite quando comparados ao controle Sham que recebeu salina (5mL/kg i.p.) (n=5). Os valores representam a média ± EPM do número de Leucocitos totais por 10³/μL. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

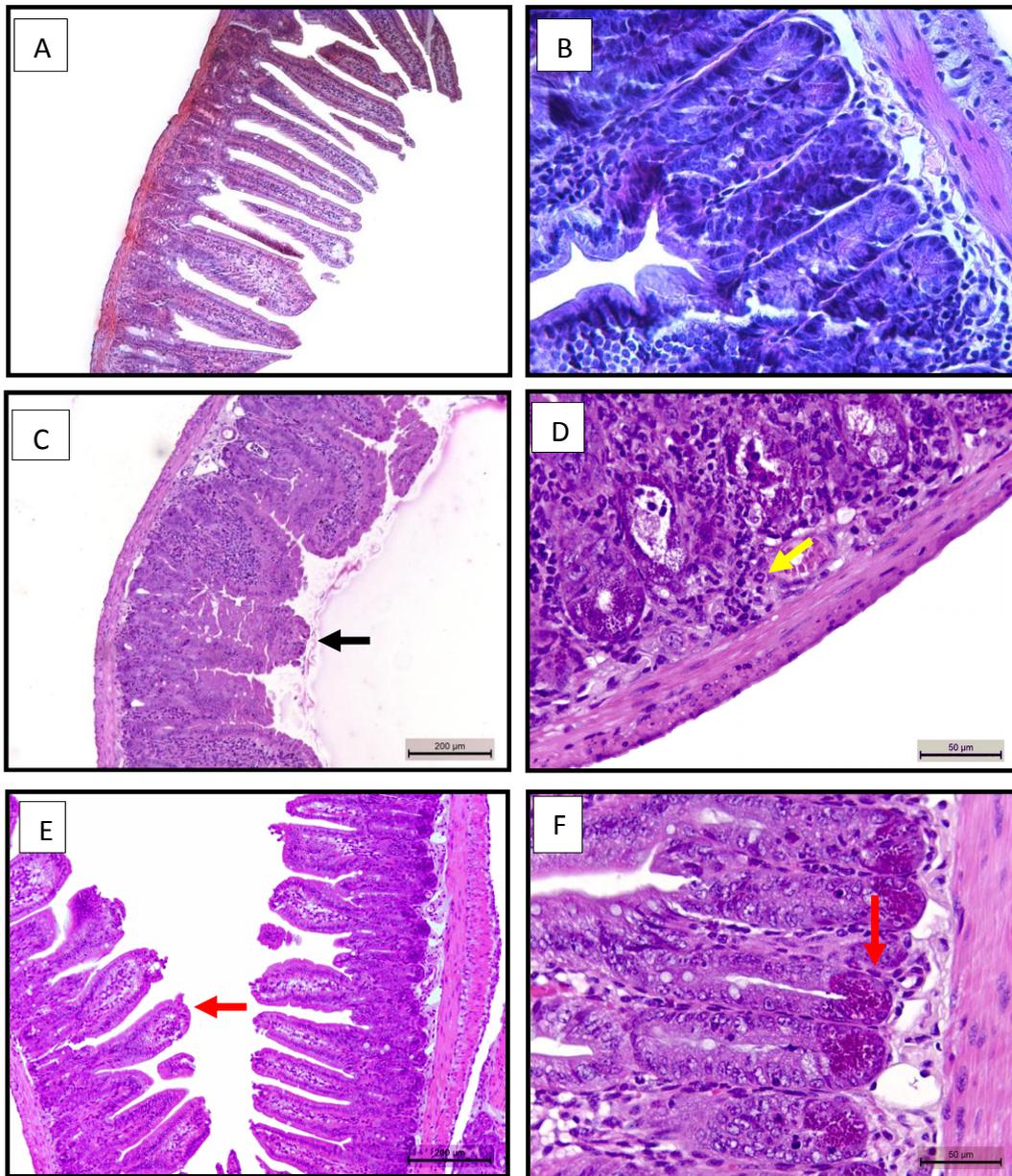
Porções do jejuno e íleo de animais foram retiradas para avaliação histopatológica de acordo com os critérios descritos por Woo *et al.* (2000). A **tabela 3** mostra que no jejuno e no íleo de animais que receberam irinotecano foram encontrados os critérios característicos da lesão intestinal relacionada à mucosite intestinal, sendo essa diferença estatisticamente significativa quando comparados ao controle Sham. No jejuno a alteração histopatológica encontrada no grupo Sham Mucosite [4(1-4)] foi estatisticamente maior ($P < 0,05$) daquela encontrada no grupo CLP Mucosite [1(1-3)]. No íleo também houve redução estatística ($P < 0,05$) entre o grupo Sham Mucosite [4(1-4)] em relação ao grupo CLP Mucosite [1(0-1)].

Tabela 3 - Avaliação das alterações histopatológicas no jejuno e íleo de animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano.

Escore histopatológico Mediana (Min-Máx)		
GRUPOS	Porções intestinais	
	Jejuno	Íleo
Sham	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Sham +Iri	4 (2 - 4)**	4 (1 - 4)**
CLP + Iri	1 (1 - 3)**#	1 (0 - 1)**#

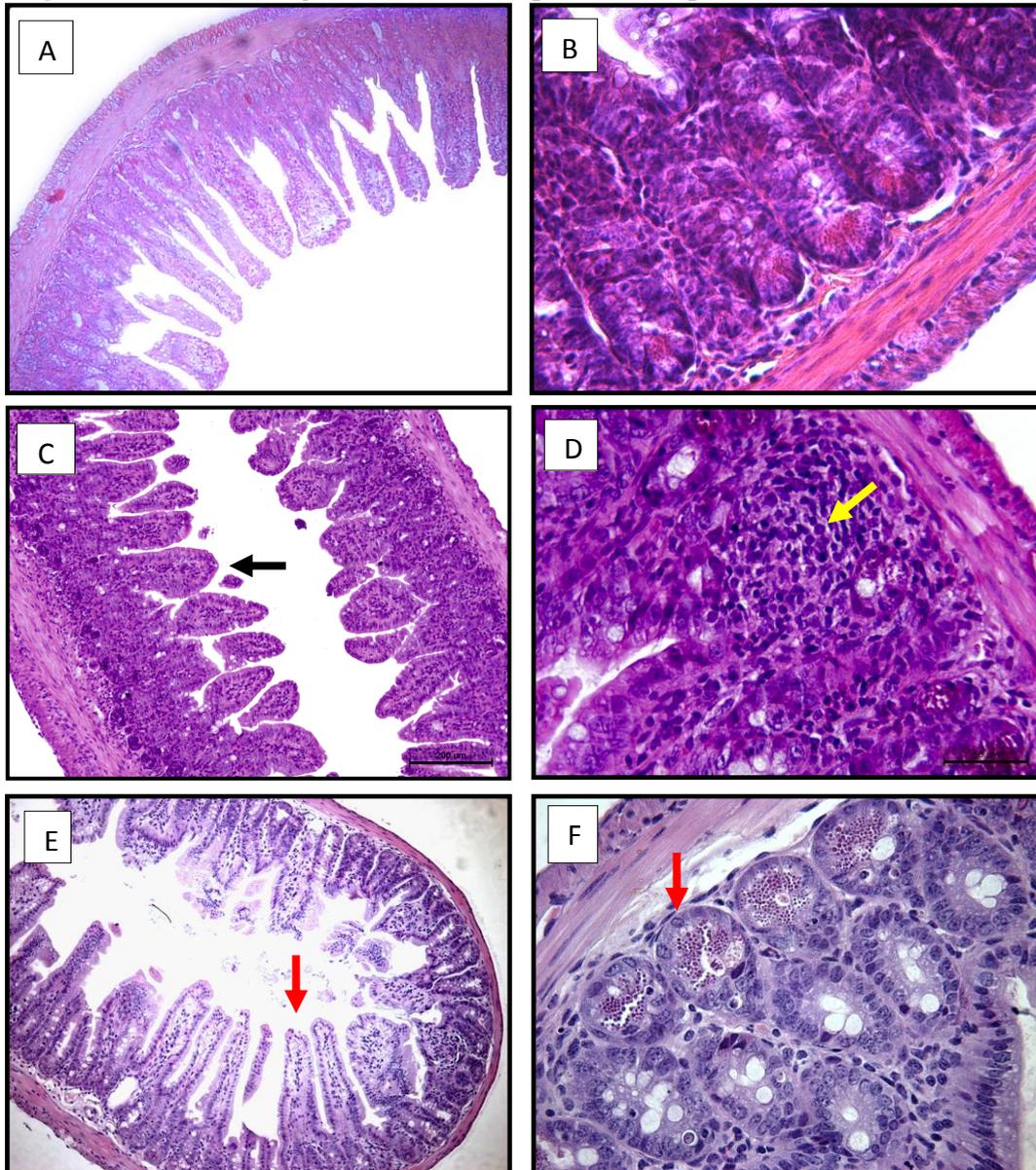
A tabela mostra redução nos parâmetros histopatológicos no jejuno e íleo dos animais do grupo CLP Mucosite quando comparados aos animais Sham Mucosite. Os dados mostram a mediana (mínimo e máximo) dos escores histopatológicos (n=5). Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs grupo sham, # $P < 0,05$ vs sham mucosite.

Figura 13 - Fotomicrografias do jejuno no quinto dia experimental de mucosite intestinal



As figuras mostram a fotomicrografia do jejuno de animais SHAM ou que passaram pela cirurgia de CLP e receberam Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. À esquerda, no aumento de 100x e à direita no aumento de 400x. **Painel A e B:** SHAM; **Painel C e D:** SHAM+IRI, encurtamento dos vilos (seta preta), leucócitos polimorfonucleares (seta amarela); **Painel E e F:** CLP+ IRI, células bem preservadas (seta vermelha).

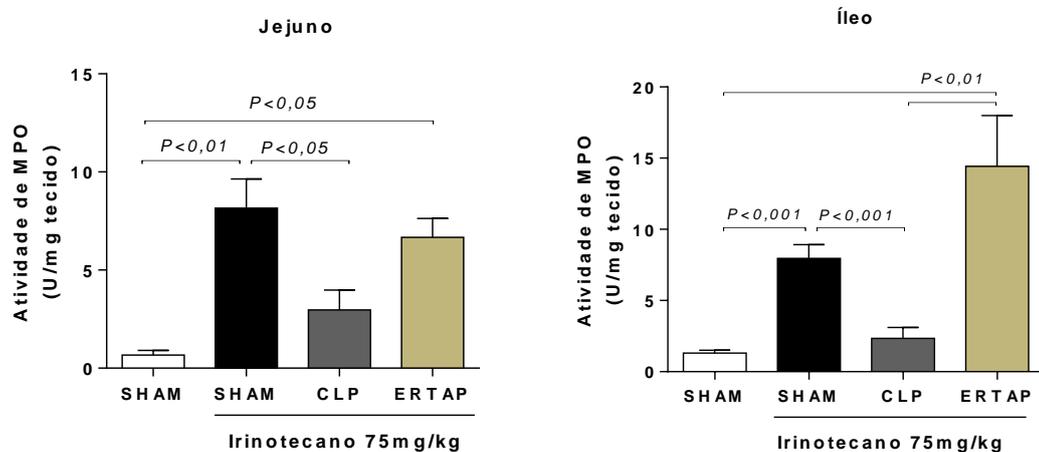
Figura 14 - Fotomicrografias do íleo no quinto dia experimental de mucosite intestinal



As figuras mostram a fotomicrografia do íleo de animais SHAM ou que passaram pela cirurgia de CLP e receberam Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. À esquerda, no aumento de 100x e à direita no aumento de 400x. **Painel A e B:** SHAM; **Painel C e D:** SHAM+IRI, necrose, encurtamento dos vilos (seta preta), leucócitos polimorfonucleares (seta amarela); **Painel E e F:**CLP+ IRI, células bem preservadas (seta vermelha).

A intensidade do infiltrado inflamatório neutrofílico foi mensurada através da atividade de mieloperoxidase no jejuno e íleo de animais como demonstrado na **Figura 15**. Em animais previamente submetidos à cirurgia de CLP que receberam irinotecano houve redução estatística ($P<0,05$) da atividade de mieloperoxidase (Jejuno: $2,963\pm 1,017$; Íleo: $2,35\pm 0,76$) quando comparados aos animais que não tiveram perfuração no ceco (Sham) e receberam irinotecano (Jejuno: $8,16\pm 1,48$; Íleo: $7,96\pm 0,96$). Não houve redução no grupo ERTAPENEM (Jejuno: $6,67\pm 0,96$; Íleo: $14,43\pm 3,56$) em nenhum dos segmentos quando comparado ao controle positivo.

Figura 15 - Dosagem de mieloperoxidase no jejuno e íleo de animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano.

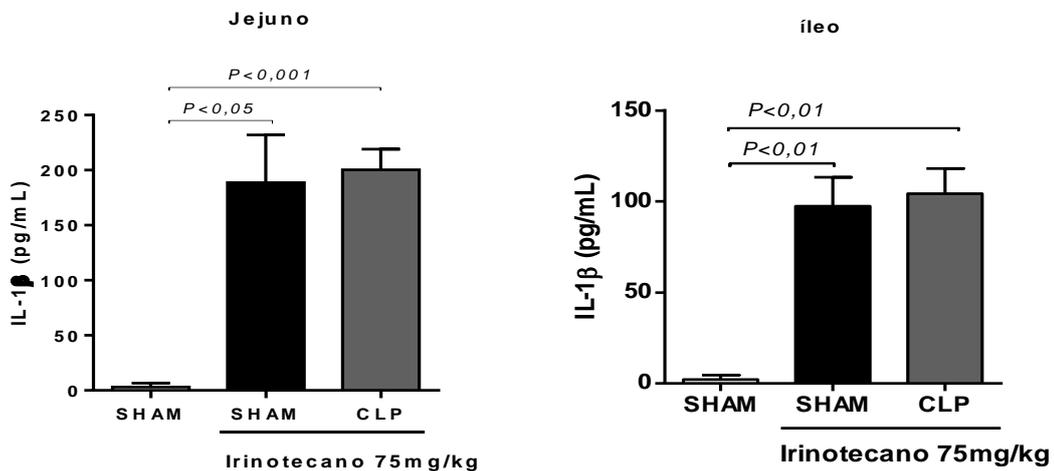


A atividade de MPO foi avaliada em amostras do jejuno e íleo de animais previamente submetidos à CLP ou Sham que receberam irinotecano (75mg/kg i.p.) e controle Sham que recebeu salina (5mL/kg i.p.). O gráfico mostra que animais previamente submetidos à CLP apresentam redução da atividade de MPO no jejuno e íleo quando comparado com o grupo Sham mucosite. Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

As **figuras 16 e 17** ilustram o efeito da administração de irinotecano (75mg/kg, i.p.) nos diferentes grupos e da administração de salina (5mL/kg, i.p.) sobre os níveis das citocinas IL-1 β e IL-10 no tecido intestinal no quinto dia experimental de mucosite intestinal.

Observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) da citocina IL-1 β no tecido intestinal dos animais sobreviventes da cirurgia de CLP (Jejuno: 200,3 \pm 18,83; Íleo: 104,2 \pm 14,00) e nos animais Sham (Jejuno: 188,6 \pm 43,27; Íleo: 97,37 \pm 15,88) que receberam irinotecano quando comparados ao controle Sham (Jejuno: 3,035 \pm 1,782; Íleo: 1,760 \pm 1,245) (**Figura 16**).

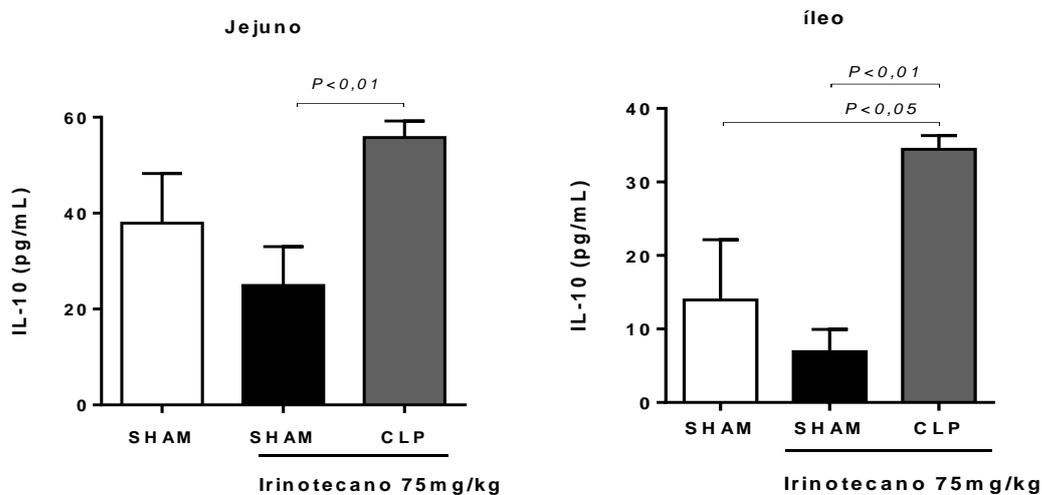
Figura 16 - Irinotecano aumenta os níveis de IL-1 β no jejuno e íleo de animais no quinto dia experimental após administração de irinotecano.



Os níveis teciduais de IL-1 β foram avaliados em amostras do jejuno e íleo de animais. O gráfico mostra aumento na dosagem dessa citocina em ambos os grupos que receberam irinotecano (75mg/kg i.p.) quando comparados com ao controle Sham (5mL/kg i.p.). Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

A **figura 17** demonstra o aumento significativo ($P < 0,01$) da citocina IL-10 no jejuno e íleo de animais do grupo CLP Mucosite (Jejuno: $55,80 \pm 3,42$; íleo: $34,45 \pm 1,87$) quando comparados ao grupo Sham Mucosite (Jejuno: $34,45 \pm 1,87$; íleo: $6,91 \pm 3,05$). Houve, ainda, aumento significativo ($P < 0,05$) no íleo de animais do grupo CLP Mucosite ($34,45 \pm 1,87$) quando comparados ao controle Sham ($13,96 \pm 8,20$).

Figura 17 - Irinotecano aumenta os níveis de IL-10 no jejuno e íleo de animais previamente submetidos à CLP.



Os níveis teciduais de IL-10 foram avaliados em amostras do jejuno e íleo de animais. O gráfico mostra aumento na dosagem dessa citocina no jejuno do grupo CLP mucosite quando comparado ao grupo Sham mucosite e no íleo quando comparado aos grupos Sham mucosite e controle Sham. Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

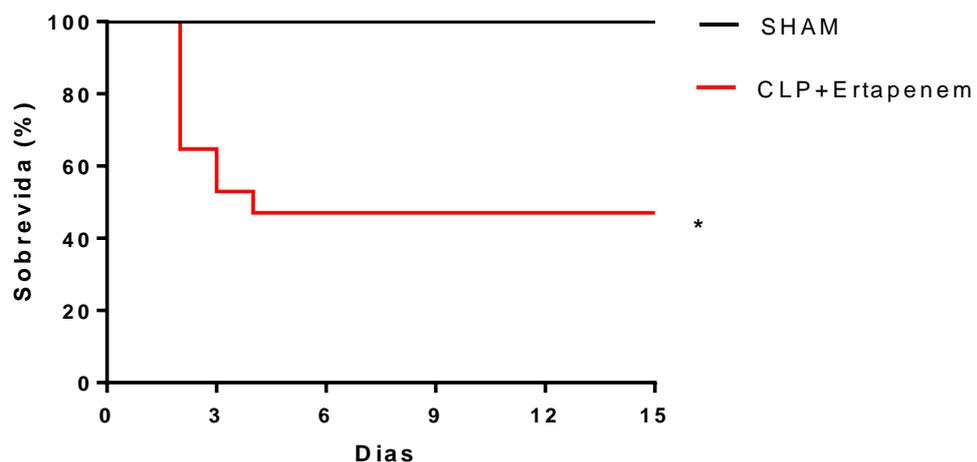
6.3 Avaliação dos parâmetros da mucosite intestinal induzida por irinotecano no sétimo dia em animais previamente submetidos à CLP e tratados com antibiótico.

As alterações nos parâmetros morfológicos e funcionais observadas na mucosite intestinal induzida por irinotecano também foram avaliadas no sétimo dia experimental. Para tanto, foi realizada uma nova cirurgia de sepse letal para indução de um quadro de imunossupressão pós sepse.

O experimento foi realizado como descrito anteriormente, em que animais foram submetidos à perfuração do ceco com consequente extravasamento do conteúdo intestinal para indução de sepse polimicrobiana grave e em seguida foi administrado o antibiótico de largo espectro Ertapenem. A administração foi realizada 6 h após a cirurgia de CLP e mantida em intervalos regulares de 12 h durante 3 dias. Os animais foram observados por 15 dias após o procedimento cirúrgico e a mortalidade foi avaliada diariamente.

A porcentagem de sobrevida obtida no 15º dia foi significativamente menor ($P<0,05$) no grupo CLP tratado com antibiótico (47%) comparado ao grupo controle Sham (100%) (Figura 18).

Figura 18 - Sobrevida de animais após indução da sepse polimicrobiana grave com tratamento antibiótico (II).

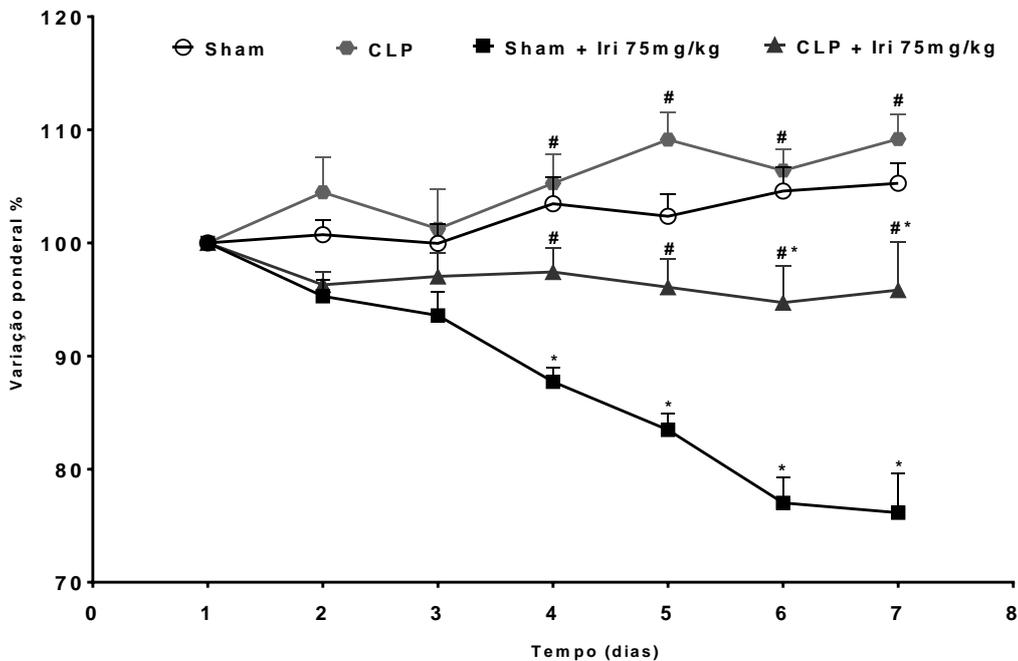


A sobrevida dos animais controles e submetidos à sepse grave com tratamento de antibiótico foi determinada diariamente por um período de 15 dias. Os animais submetidos à CLP receberam uma perfuração transfixante com a agulha 18G. Na 6ª h após a cirurgia, os animais sépticos foram tratados com antibiótico Ertapenem sódico (20mg/ Kg), e a administração mantida em intervalos de 12h, durante 3 dias. Os SHAM operados não tiveram perfurações no ceco e receberam solução salina (5mL/kg, i.p.). Os dados correspondem às porcentagens de sobrevivência de seis a oito animais por grupo. As taxas de mortalidade foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de Log-rank. * $P<0,005$ vs grupo Sham.

Animais previamente submetidos ao modelo de indução de sepse letal através da cirurgia (CLP) ou que passaram pela cirurgia, mas não pela perfuração do ceco (Sham) foram tratados com irinotecano (75mg/kg, i.p) ou solução salina (5mL/kg, i.p.).

A porcentagem da variação da massa corpórea encontra-se ilustrada na **figura 19**. Animais do grupo Sham mucosite apresentaram redução ponderal significativa ($P<0,05$) a partir do quarto dia experimental quando comparado ao grupo CLP Mucosite, CLP e controle Sham (redução de 19,4%; 34,5% e 29,9% respectivamente). No grupo CLP Mucosite observou-se redução (11%) na massa corpórea apenas a partir do sexto dia experimental ($P<0,05$).

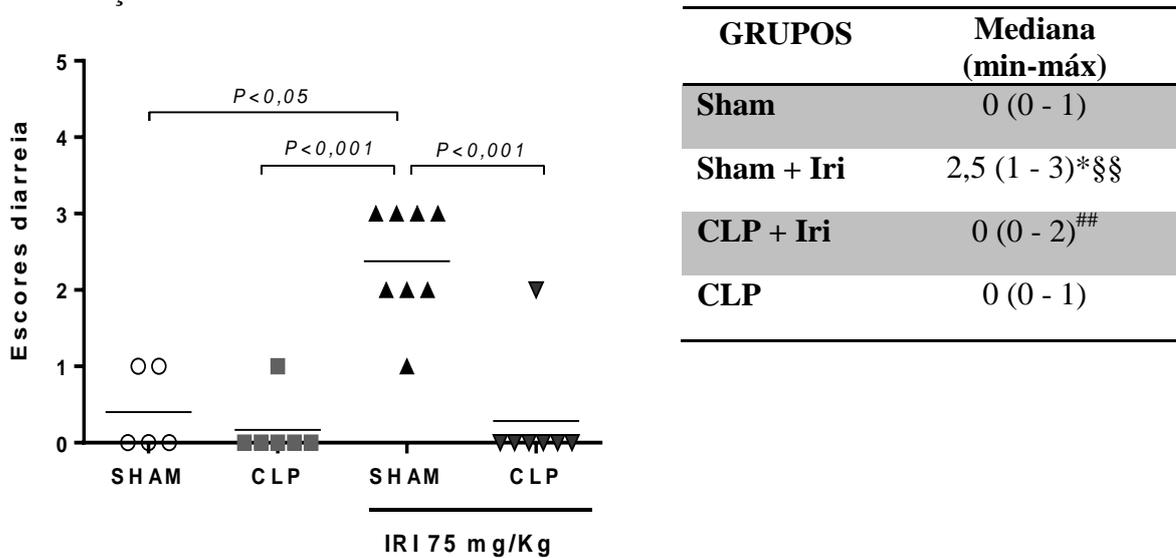
Figura 19 - Variação ponderal em função do tempo de animais até o sétimo dia experimental após a administração de irinotecano.



A avaliação ponderal dos animais (n=7-8) foi mensurada diariamente por todo o período experimental de mucosite intestinal. Os animais dos grupos controle CLP e Sham não apresentaram variação ponderal significativa. O grupo Sham mucosite apresentou perda ponderal significativa em relação ao grupo CLP mucosite e aos controles CLP e Sham. Os pontos representam média \pm EPM da variação percentual de massa corpórea, calculada através das diferenças das massas corpóreas obtidas diariamente e a massa inicial. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA/Bonferroni * $p<0,05$ vs sham, # $p<0,05$ vs sham mucosite.

Os escores propostos por Kurita *et al.* (2000) foram utilizados para avaliar a gravidade da diarreia causada por irinotecano. No grupo controle positivo (Sham Mucosite) houve indução de uma diarreia moderada a grave no sétimo dia [2,5(1-3)], caracterizada por fezes úmidas com sujidade perianal, que foi diferente significativamente dos grupos Sham [0(0-1)], CLP [0(0-1)] e CLP Mucosite[0(0-2)], que apresentaram mediana grau zero de diarreia ($P < 0,05$) (Figura 20).

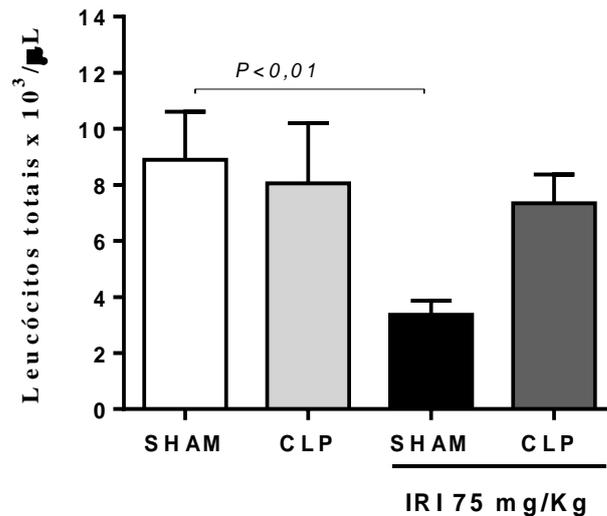
Figura 20 - Avaliação dos escores de diarreia no sétimo dia experimental após a administração de irinotecano



Os animais do grupo CLP ou Sham receberam irinotecano 75mg/kg ou salina (5 mL/kg, i.p.) durante 4 dias. Os escores de diarreia foram analisados no sétimo dia (n=5-8). Os animais do grupo CLP mucosite apresentaram diarreia de grau leve a moderada, que foi estatisticamente diferente daquela apresentada nos demais grupos. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). * $P < 0,05$ vs grupo sham, ## $P < 0,01$ vs grupo sham mucosite, §§ $P < 0,05$ vs grupo CLP.

A partir da figura 21 é possível visualizar a redução significativa ($P<0,01$) de aproximadamente 62,1% no número de leucócitos totais no sangue periférico de animais do grupo Sham sete dias após a primeira injeção de irinotecano quando comparados ao controle Sham que recebeu solução salina (**Figura 21**).

Figura 21 - Irinotecano induz leucopenia em animais no sétimo dia experimental após administração de irinotecano.



Animais tratados com irinotecano (75mg/kg, i.p.) apresentaram significativa leucopenia no sétimo dia experimental no grupo Sham Mucosite quando comparados ao controle Sham que recebeu salina (5mL/kg i.p.) (n=5-8). Os valores representam a média \pm EPM do número de Leucocitos totais por $10^3/\mu\text{L}$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

A avaliação histopatológica do jejuno e íleo de animais foi realizada de acordo com os critérios descritos por Woo *et al.* (2000). A **tabela 4** mostra que apenas no íleo houve reversão do dano característico de mucosite intestinal em animais do grupo CLP Mucosite [2(1-3)] em relação ao grupo controle positivo Sham Mucosite [4(3-4)], sendo essa diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$).

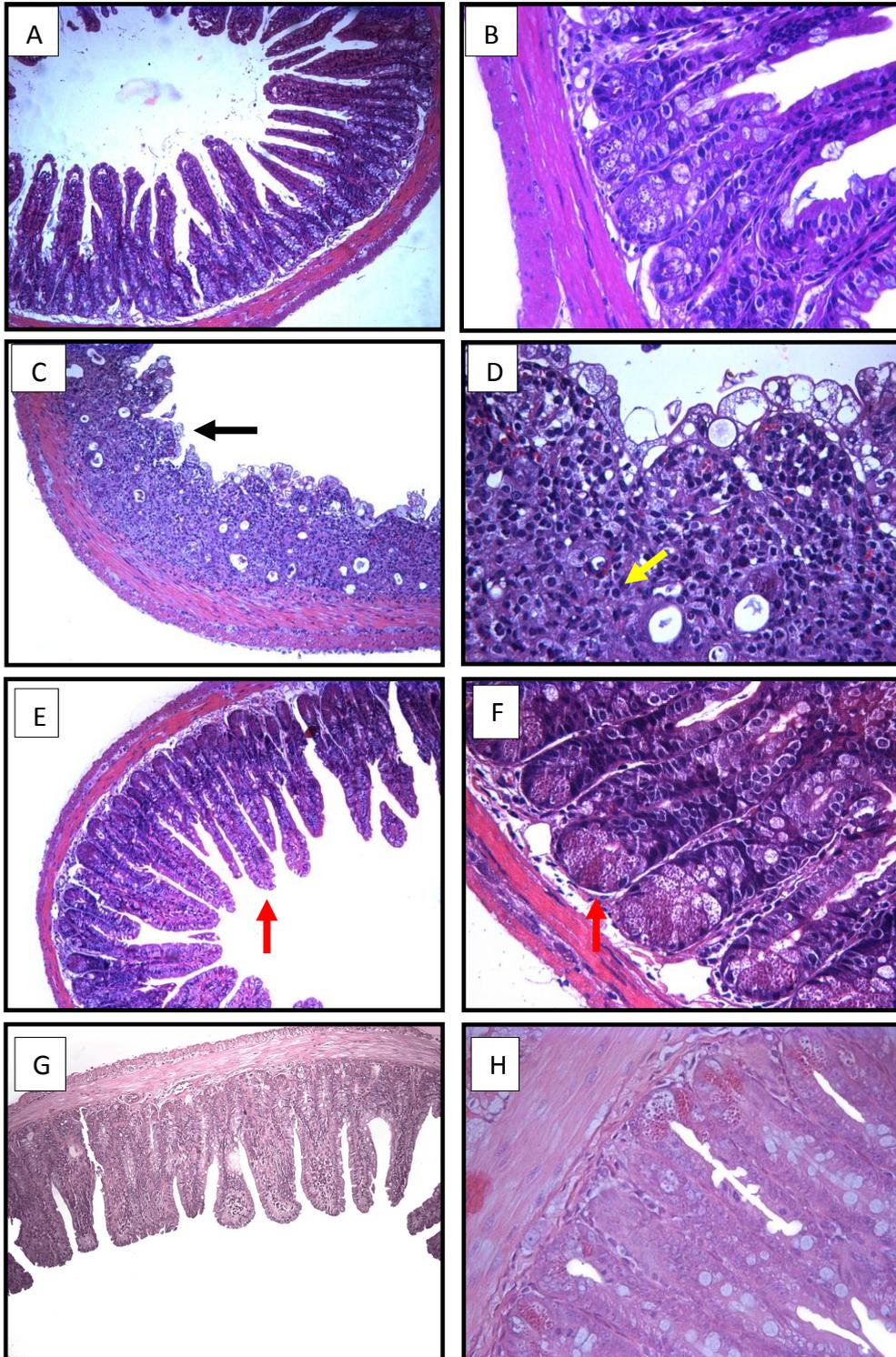
. As referidas alterações estão evidenciadas nas fotomicrografias do íleo (**Figura 22**) em que se verificaram uma destruição da arquitetura dos vilos e criptas, presença de células polimorfonucleares e necrose de células da cripta no grupo controle positivo. Tais alterações foram em parte revertidas em animais previamente submetidos à CLP que receberam irinotecano.

Tabela 4 - Avaliação das alterações histopatológicas no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental após administração de irinotecano.

GRUPOS	Escore histopatológico Mediana (Min-Máx)	
	Porções intestinais	
	Jejuno	Íleo
Sham	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)
Sham + Iri	4 (2 - 4) ^{***§§}	4 (3 - 4) ^{**§}
CLP + Iri	2 (1 - 3)	2 (1 - 3) [#]
CLP	1 (0 - 3)	1 (1 - 2)

A tabela mostra redução nos parâmetros histopatológicos no íleo dos animais do grupo CLP Mucosite quando comparados aos animais Sham Mucosite. Os dados mostram a mediana (mínimo e máximo) dos escores histopatológicos. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. ^{**} $P < 0,01$, ^{***} $P < 0,001$ vs grupo sham, [#] $P < 0,05$ vs sham mucosite, [§] $P < 0,05$, ^{§§} $P < 0,01$ vs grupo CLP.

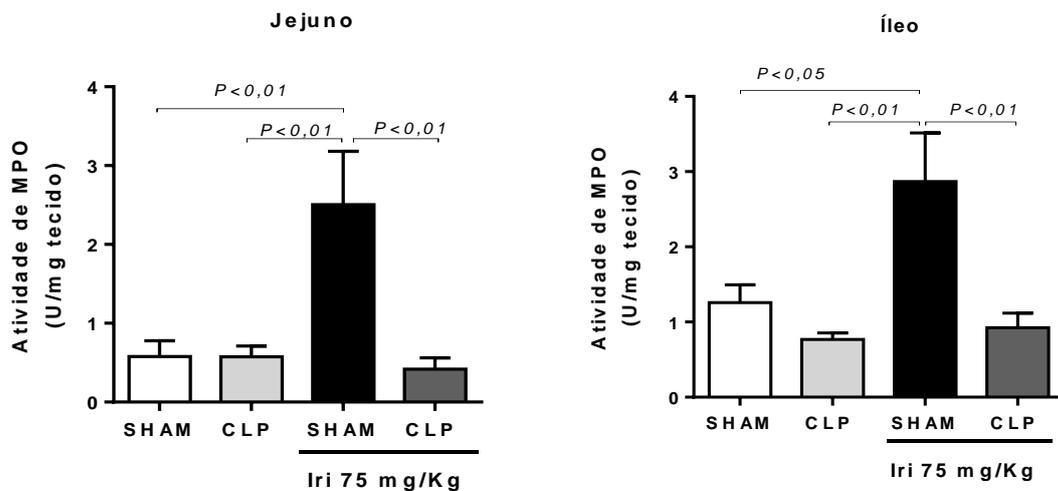
Figura 22 - Fotomicrografias do íleo no sétimo dia experimental de mucosite intestinal.



As figuras mostram a fotomicrografia do íleo de animais SHAM ou que passaram pela cirurgia de CLP e receberam Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. À esquerda, no aumento de 100x e à direita no aumento de 400x. **Painel A e B:** SHAM; **Painel C e D:** SHAM+IRI, necrose, encurtamento dos vilos (seta preta), leucócitos polimorfonucleares (seta amarela); **Painel E e F:** CLP+ IRI, células bem preservadas (seta vermelha); **Painel G e H:** CLP, células bem preservadas

A atividade de mieloperoxidase foi avaliada como demonstrado na **figura 23**. Em animais previamente submetidos à cirurgia de CLP que receberam irinotecano houve redução estatística ($P<0,05$) da atividade de mieloperoxidase (Jejuno: $0,4168\pm 0,1441$; Íleo: $0,923\pm 0,1949$) quando comparados aos animais que não tiveram perfuração no ceco (Sham) e receberam irinotecano (Jejuno: $2,506\pm 0,6754$; Íleo: $2,867\pm 0,6494$).

Figura 23 - Dosagem de mieloperoxidase no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental após administração de irinotecano.



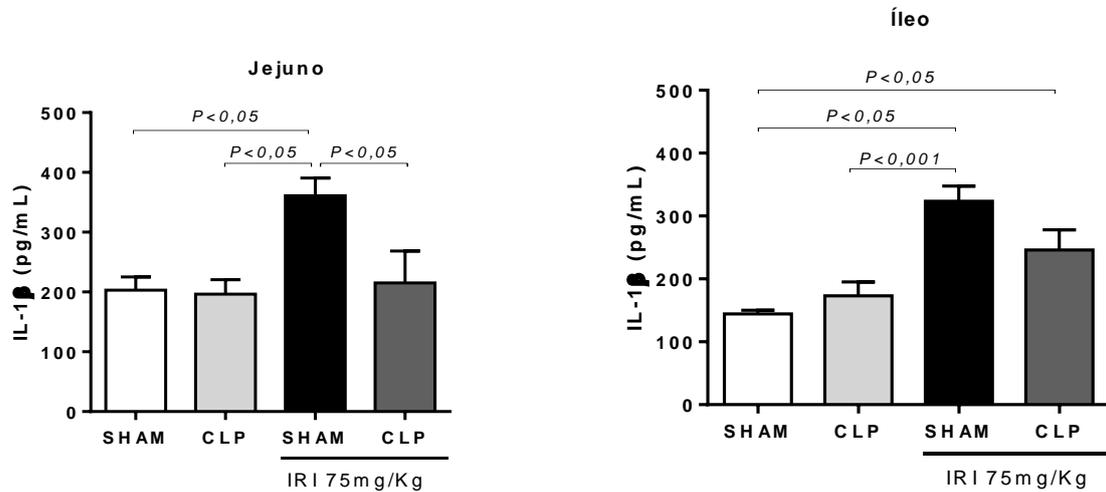
A atividade de MPO foi avaliada em amostras do jejuno e íleo de animais previamente submetidos à CLP ou Sham que receberam irinotecano (75mg/kg i.p.) ou salina (5mL/kg i.p.). O gráfico mostra que animais previamente submetidos à CLP apresentam redução da atividade de MPO no íleo quando comparado com o grupo Sham mucosite. Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

As **figuras 24** e **25** ilustram o efeito nos diferentes grupos da administração de irinotecano (75mg/kg, i.p.) ou solução salina (5mL/kg, i.p.) sobre os níveis das citocinas IL-1 β e IL-10 no tecido intestinal no sétimo dia experimental de mucosite intestinal.

Houve redução significativa ($P<0,05$) nos níveis da citocina IL-1 β apenas no jejuno de camundongos sobreviventes da sepse letal (CLP) ($215,3\pm 53,18$) que receberam irinotecano quando comparados ao controle positivo Sham mucosite ($361,2\pm 29,23$) (**Figura 24**).

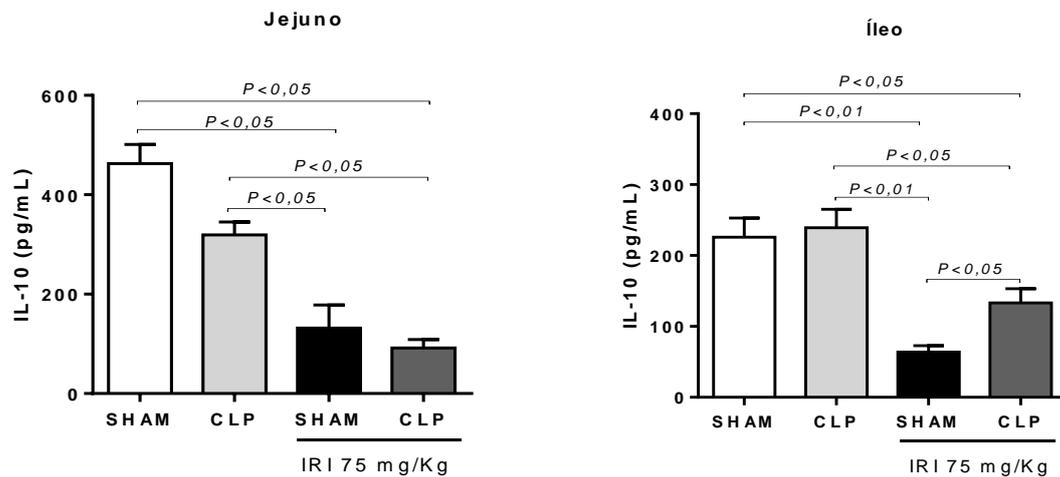
Conforme visualizado na **figura 25** há uma diferença estatística ($P<0,05$) nos níveis de IL-10 entre os grupos após a administração de irinotecano, onde se observa um aumento apenas no íleo no grupo CLP ($133,0\pm 20,25$) em relação ao grupo Sham ($63,67\pm 9,078$).

Figura 24 - Efeito da administração de Irinotecano nos níveis de IL-1 β no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental de mucosite intestinal.



Os níveis teciduais de IL-1 β foram avaliados em amostras do jejuno e íleo de animais. O gráfico mostra um aumento na dosagem dessa citocina em ambas as porções intestinais no grupo Sham mucosite em relação ao controle Sham, e no jejuno em relação ao grupo CLP mucosite. Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Figura 25 - Efeito da administração de Irinotecano nos níveis de IL-10 no jejuno e íleo de animais no sétimo dia experimental de mucosite intestinal.



Os níveis teciduais de IL-10 foram avaliados em amostras do jejuno e íleo de animais. O gráfico mostra uma redução na dosagem dessa citocina em ambas as porções intestinais no grupo Sham mucosite em relação ao controle Sham, e no íleo em relação ao grupo CLP mucosite. Os valores representam a média \pm EPM. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

7 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o modelo de sepse polimicrobiana grave foi reproduzido com êxito, uma vez que os animais operados apresentaram 100% de mortalidade dois dias após a cirurgia de CLP. Ao se administrar o antibiótico de largo espectro Ertapenem na dose de 20mg/kg em animais após a cirurgia de indução de sepse obteve-se uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 50%. Esse dado foi semelhante ao encontrado nos estudos de Nascimento *et al.* (2010), constituindo-se um importante parâmetro para confirmar o êxito na reprodução do modelo experimental.

Os animais que sobreviveram ao protocolo anterior foram, então, submetidos à indução de mucosite intestinal por irinotecano. Para tanto, utilizou-se o protocolo adaptado por Wong (2013), previamente estabelecido por Melo (2008) e Lima-Júnior (2012), em que se realizam injeções diárias de irinotecano por quatro dias consecutivos. É importante ressaltar que o modelo de indução de mucosite intestinal utilizado nesse estudo é capaz de mimetizar com fidedignidade as alterações observadas na prática clínica.

Os trabalhos supracitados estudaram de maneira detalhada as alterações inflamatórias em porções do intestino delgado causadas pelo irinotecano. As alterações clássicas da mucosite intestinal reproduzidas naqueles estudos incluem a observação da presença de extenso infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal, perda da integridade da arquitetura das criptas e achatamento dos vilos, intensa diarreia, além da participação de citocinas pró-inflamatórias (LIMA-JÚNIOR, 2012; MELO, 2008; WONG, 2013).

No trabalho de Lima-Júnior *et al.* (2012) foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Neste trabalho observou-se uma importante diarreia já a partir do quinto dia experimental, acompanhada de aumento na mortalidade dos animais. A dose de irinotecano utilizada foi mais baixa (60mg/kg) do que aquela utilizada nos nossos estudos.

Na tentativa de estabelecer o melhor dia para a eutanásia de camundongos C57BL/6 Wong (2013) avaliou as alterações inflamatórias e os eventos relacionados à mucosite intestinal no quinto dia e no sétimo dia após a primeira injeção de irinotecano. Uma diarreia de grau moderado foi visualizada no quinto dia e de grau severo no sétimo dia experimental, além das demais alterações de caráter morfológico clássicas da mucosite intestinal.

Em nosso estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Devido a esse fato, os critérios

inflamatórios da mucosite intestinal por irinotecano foram avaliados no quinto dia experimental quando utilizados camundongos provenientes do Biotério da FMRP-USP e no sétimo dia quando utilizados camundongos provenientes do Biotério do DFF-UFC. No nosso trabalho, a diarreia no sétimo dia experimental foi semelhante em relação àquela apresentada por Wong (2013). Curiosamente, a diarreia apresentada em nossos animais no quinto e no sétimo dia experimental foram mais branda em relação àquela mostrada no trabalho de Lima-Júnior (2012), mesmo com a utilização de uma dose mais elevada de irinotecano (75mg/kg). Não sabemos ao certo a real razão para estas diferenças, entretanto podemos supor que possa ser consequência do uso de diferentes amostras farmacêuticas de irinotecano, um de marca original (Camptosar[®]) e um similar (Evoterim[®]).

Tratando-se, ainda, do trabalho desenvolvido por Wong (2013), foram avaliadas as alterações morfológicas causadas pelo irinotecano em todas as porções do intestino delgado e no intestino grosso, embora o estudo mais aprofundado quanto às alterações inflamatórias e envolvimento da participação de bactérias no desenvolvimento desta doença tenha se concentrado principalmente no jejuno e íleo, sendo esta a razão que motivou o estudo dessas porções neste trabalho.

Em nossos experimentos foi verificada uma redução da atividade de mieloperoxidase no jejuno e íleo de animais tratados com irinotecano e previamente expostos à sepse polimicrobiana grave. Esse resultado poderia explicar, pelo menos em parte, que as alterações advindas da utilização de irinotecano, como perda da arquitetura intestinal, seriam prevenidas por um menor infiltrado inflamatório de neutrófilos na mucosa intestinal. Em trabalho recente desenvolvido em colaboração com pesquisadores do grupo LAFICA, Guabiraba *et al.* (2013), demonstraram elegantemente a relação entre a melhora nos escores clínicos e danos histopatológicos da mucosite intestinal induzida por irinotecano mediante a utilização de anticorpo anti-Ly6G, capaz de depletar neutrófilos, sugerindo que tais células parecem desempenhar um papel de destaque na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

No mesmo estudo, a relação positiva entre o aumento dos níveis da citocina IL-33 no intestino delgado de animais e o recrutamento de neutrófilos para a mucosa intestinal com consequente dano ao epitélio também ficou demonstrada. Para tanto, os pesquisadores seguiram com a administração desta citocina em camundongos submetidos à mucosite intestinal por irinotecano. Os resultados demonstraram uma piora na avaliação dos escores clínicos, histopatológicos, alterações inflamatórias, aumento da bacteremia e acentuação da leucopenia.

Adicionalmente, os parâmetros citados foram novamente avaliados ao se bloquear a via IL-33/ST2 através da utilização de camundongos *knockout* para o receptor de IL-33 (ST2^{-/-}). Os resultados encontrados corroboram com os anteriormente descritos, uma vez que observou-se uma melhora de todos os parâmetros citados anteriormente. Esses achados foram relacionados com a presença de infiltrado neutrofílico na mucosa intestinal de animais, visto que a administração de IL-33 foi capaz de aumentar os danos associados ao uso do irinotecano, embora não tenha sido eficiente em induzir esses mesmos danos quando utilizado em animais tratados com anticorpo anti-Ly6G. A migração de neutrófilos mostrou-se parcialmente dependente do aumento da produção de quimiocinas CXCL1, CXCL2, CCL2 e do aumento da expressão de CXCR2, receptor presente na superfície de neutrófilos, no intestino delgado e no sangue de animais (GUABIRABA *et al.*, 2013).

Esses dados mostram que a IL-33 estaria envolvida no aumento do recrutamento de neutrófilos para o tecido intestinal e que estes seriam responsáveis pelo dano à mucosa em animais tratados com irinotecano. Adicionalmente, foi demonstrado que esta citocina está sendo produzida em células epiteliais intestinais de animais expostos ao irinotecano (GUABIRABA *et al.*, 2013).

No presente estudo, animais que foram previamente expostos à sepse polimicrobiana grave e que sobreviveram após antibioticoterapia adequada, quando tratados com irinotecano apresentaram uma redução significativa do infiltrado neutrofílico na mucosa intestinal quando comparados aos animais que não passaram pelo procedimento cirúrgico para indução da sepse, mas que foram tratados com irinotecano, sugerindo que no cenário de um estado de pós sepse grave parece haver uma atenuação de eventos classicamente associados à resposta inflamatória, como é o caso da migração de neutrófilos.

Dados semelhantes ao encontrado em nosso trabalho tem sido observados no contexto da sepse grave, em que está bem documentada a falência na migração de neutrófilos para o foco infeccioso. Uma redução dos níveis de IL-33 durante a sepse grave tem sido associada a uma piora nos escores clínicos, redução nas taxas de sobrevivência e aumento da bacteremia no sangue e no peritônio de animais. A redução nos níveis dessa citocina aliado à ativação de receptores Toll-like parecem ser os responsáveis pelos estímulos envolvidos na internalização do receptor CXCR2 presente na superfície de neutrófilos. Esses eventos parecem resultar em falência no recrutamento de neutrófilos para o foco infeccioso (ALVES-FILHO, 2010).

O mecanismo responsável pela redução no infiltrado neutrofílico na mucosa de animais sobreviventes da sepse grave que receberam irinotecano observado em nosso trabalho ainda não foi investigado. Contudo, torna-se lícito especular que a diminuição dos níveis da

citocina IL-33, que tem sido associada à falência no recrutamento de neutrófilos observada no contexto da sepse grave, poderia também se manter no estado pós-sepse e, dessa forma, contribuir para a prevenção dos danos intestinais no curso da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano.

À essa altura nos perguntávamos se a redução na atividade de mieloperoxidase observada no intestino de animais sobreviventes da sepse grave que receberam antibioticoterapia e posteriormente irinotecano, se daria não por conta da exposição prévia à sepse polimicrobiana grave, mas sim como consequência da utilização do antibiótico Ertapenem, possuidor de um amplo espectro de ação bactericida. Deste modo, questionou-se se este último poderia estar causando, entre outros efeitos, uma modificação na microbiota intestinal desses animais, que poderia estar cursando com uma atenuação das alterações inflamatórias e dos eventos associados ao tratamento quimioterápico.

Esse questionamento tornou-se ainda mais relevante ao se analisar o trabalho desenvolvido por Wong (2013), em que ficou demonstrado que a injeção de irinotecano em camundongos é sequencialmente acompanhada de um aumento no crescimento de bactérias no sangue, assim como de um aumento da translocação bacteriana para órgãos estéreis tais como linfonodo mesentérico e fígado. Ainda no mesmo trabalho, com a utilização de ferramentas baseadas em engenharia genética, qual seja animais depletados de genes para o receptor Toll-like 2 (TLR2^{-/-}) e para a proteína adaptadora MyD88 (MyD88^{-/-}) foi possível se verificar uma reversão e/ou atenuação significativa da perda ponderal, do dano funcional relacionado à diarreia, bem como das alterações morfométricas e histopatológicas claramente observadas nos animais controle (*wild type*) tratados com irinotecano. Estes dados sugerem que a presença de bactérias parece se correlacionar ao desenvolvimento do dano intestinal e da diarreia associada ao irinotecano. Sendo assim, tornou-se razoável supor que a utilização de um antibiótico de largo espectro administrado anteriormente ao irinotecano poderia estar contribuindo para reduzir as alterações inflamatórias observadas no curso da mucosite intestinal por causar uma modificação na microbiota intestinal.

Neste momento, propôs-se um experimento em que animais seriam submetidos ao procedimento cirúrgico, sem, contudo, haver perfuração do ceco e extravasamento de bactérias para a cavidade peritoneal, mas que recebessem o tratamento com o antibiótico seguindo o mesmo protocolo de administração utilizado após a cirurgia de indução de sepse grave por CLP. O resultado da dosagem de mieloperoxidase nos animais que receberam o antibiótico mas que não foram submetidos à cirurgia de CLP foi semelhante àquele encontrado no grupo controle irinotecano. Este resultado nos levou a concluir que ,

possivelmente a prevenção dos danos observados no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano seria advinda de uma mudança no padrão da resposta imune resultante de um estado pós-sepse grave e não da utilização do antibiótico ertapeném, embora sejam necessários mais parâmetros para confirmar tal hipótese.

Ao se mensurar diariamente a variação ponderal dos animais durante todo o período experimental de mucosite intestinal, observou-se que em animais sobreviventes da sepse grave que receberam irinotecano houve uma importante prevenção da perda ponderal a partir do quarto dia experimental. Essa prevenção mostrou-se ainda mais acentuada a partir do sexto dia experimental, momento em que os animais do grupo controle irinotecano apresentam maior perda ponderal e os animais sobreviventes da sepse continuaram a apresentar pouca variação ponderal.

Vários trabalhos, incluindo aqueles do LAFICA, tem atribuído a redução de peso observada em animais com mucosite induzida por agentes antineoplásicos, entre os quais o irinotecano, a uma diminuição da absorção de alimentos devido às alterações nas vilosidades intestinais e à perda de água e eletrólitos provocada em consequência da diarreia (CARNEIRO *et al.*, 2004; DUNCAN; GRANT, 2003; MELO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013).

É importante salientar que a diarreia induzida pela quimioterapia, incluindo o irinotecano, parece ter um componente primariamente secretório e um componente exudativo (VIELE, 2003). A diarreia secretória resulta de uma estimulação da capacidade secretória intestinal. Certos estímulos tais como, enterotoxinas bacterianas, ácido biliar, mediadores inflamatórios e hormônios gerados pelos tumores neuroendócrinos, podem causar a diarreia secretória (FIELD, 2003). A diarreia exudativa é causada pelo rompimento do epitélio intestinal, levando à perda de água e eletrólitos, muco, proteínas, e algumas vezes perda de células, incluindo hemácias e leucócitos, de vasos sanguíneos e linfáticos. O distúrbio da motilidade pode também resultar em diarreia. O aumento da motilidade intestinal reduz o tempo para absorção e aumenta o volume das fezes (VIELE, 2003).

De fato, nos animais sobreviventes da sepse grave que receberam irinotecano foi observada uma atenuação na gravidade do quadro da diarreia bem como uma prevenção do dano à mucosa intestinal no jejuno e no íleo de animais no quinto dia experimental e no íleo no sétimo dia experimental. A prevenção do dano epitelial, avaliada através de critérios histopatológicos, parece conferir aos animais uma superfície íntegra de absorção de água e nutrientes, desta forma, contribuindo para uma prevenção na perda ponderal e na gravidade da diarreia.

Ao levantarmos novamente a hipótese de que em nossos animais pós sepse grave haveria uma possível redução nos níveis da citocina IL-33, acabamos por corroborar novamente os nossos resultados com aqueles descritos por Guabiraba *et al.* (2013). Em tal estudo ficou demonstrado que animais *knockout* para o receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) quando tratados com irinotecano, apresentaram uma reduzida perda de massa corpórea avaliada até o quarto dia experimental, reduzidos escores histopatológicos de dano intestinal, aumento no tamanho das vilosidades intestinais, aumento da razão vilo/crípta e reduzida permeabilidade vascular no intestino delgado, sendo esta última visualizada através do extravazamento do corante Azul de Evans. Esses dados foram corroborados ao se administrar um anticorpo anti-IL-33 (α -IL-33) assim como seu receptor solúvel (sST2). Desta forma, uma possível redução desta citocina em nossos animais sobreviventes da sepse grave que receberam irinotecano poderia estar contribuindo para preservação da arquitetura intestinal, contribuindo para uma menor diarreia e uma menor perda de massa corpórea. Além disso, a redução no infiltrado neutrofílico na mucosa intestinal, discutido anteriormente, também poderia contribuir para a prevenção dos parâmetros supracitados.

Em nossos resultados também foi observada uma leucopenia no quinto dia experimental tanto em animais sobreviventes da sepse por CLP que receberam irinotecano quanto em animais que passaram apenas pelo procedimento cirúrgico (SHAM) e receberam tratamento com irinotecano. Interessantemente, no sétimo dia experimental de mucosite intestinal uma leucopenia ocorreu apenas no grupo controle irinotecano, demonstrando o efeito citotóxico do quimioterápico, mas o mesmo não ocorreu em animais sobreviventes de sepse grave que receberam irinotecano. De forma coerente com a nossa hipótese de que haja uma possível redução nos níveis de IL-33, Guabiraba *et al.* (2013) observaram que em animais *knockout* para o receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) houve um aumento na contagem de leucócitos totais no sangue periférico de animais, que coincide com uma redução na aderência de leucócitos na microvasculatura mesentérica.

A bem verdade, parece intrigante o fato de que apenas no sétimo dia experimental de mucosite intestinal não foi observado leucopenia nos animais sobreviventes da sepse que receberam tratamento quimioterápico, em detrimento dos animais do mesmo grupo mas que foram avaliados no quinto dia experimental. Esta observação poderia ser explicada pelo fato de que o protocolo de indução de mucosite intestinal utilizado em nossos experimentos baseia-se na administração de doses diárias de irinotecano por quatro dias consecutivos, período a partir do qual cessa-se o tratamento até que a eutanásia seja realizada no quinto e sétimo dias experimentais. Desta forma, torna-se lícito supor que os efeitos citotóxicos do

irinotecano poderiam estar mais acentuados quando se avaliam os animais no quinto dia experimental, primeiro dia subsequente à última administração de irinotecano. Deste modo, caso haja algum estímulo envolvido que seja capaz de estar elevando a contagem de leucócitos para os níveis normais, este possivelmente seria capaz de se sobrepor ao mecanismo citotóxico do irinotecano apenas no sétimo dia experimental, momento em que houve maior intervalo entre a última administração de irinotecano e a eutanásia dos animais.

A participação da citocina pró-inflamatória IL-1 β foi também avaliada em nosso trabalho, no qual demonstrou-se não haver diferença entre os animais sobreviventes da sepse grave que receberam irinotecano e os animais controle irinotecano. A exceção se deu somente na secção intestinal do jejuno de animais sobreviventes da sepse que foram avaliados no sétimo dia experimental de mucosite intestinal. Embora tenha sido visualizada essa redução no jejuno de animais no sétimo dia experimental, essa redução não implicou em proteção do dano à mucosa intestinal.

Melo *et al.* (2008); Lima-Junior (2008) e Wong (2013) demonstraram que a administração i.p de 75 mg/kg de irinotecano, uma vez ao dia, durante 04 dias, provoca dano à mucosa intestinal dos animais, induzindo uma mucosite intestinal caracterizada por alterações morfofuncionais, diarreia intensa e uma resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β , avaliados no 7º dia após a primeira aplicação do Irinotecano.

Tem sido demonstrado que as citocinas regulam e amplificam a resposta imune, induzem injúria tecidual e intermedeiam complicações como a diarreia. Citocinas inflamatórias, tais como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α estimulam a secreção de outras citocinas, metabólitos do ácido araquidônico e proteases por macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso, fibroblastos e células epiteliais (SARTOR, 1994). Williams *et al.* (2001) mostraram que citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- α e IL-2 contribuem para a severidade e manutenção da injúria na mucosite intestinal. Conforme já descrito por Melo *et al.* (2008), há clara participação das citocinas TNF- α , IL-1 β e KC (IL-8) na patogênese da mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano, uma vez que seus níveis encontram-se aumentados, principalmente no sétimo dia e, por outro lado coerentemente reduzidos quando os animais são pré-tratados com talidomida ou pentoxifilina,, inibidores da síntese de TNF- α e de TNF- α , IL-1 β e KC (IL-8), respectivamente.

Portanto, dando continuidade no nosso trabalho, nossos resultados são semelhantes àqueles apresentados por Melo (2008), Lima-Junior (2008) e Wong (2013). No nosso trabalho também foi observado aumento da citocina IL-1 β na grande maioria dos grupos que foram

submetidos ao irinotecano não havendo diferença entre os animais sobreviventes da sepse grave que receberam irinotecano e os animais controle irinotecano. Houve diferença com relação ao controle mucosite somente no jejuno de animais sobreviventes da sepse que foram avaliados no sétimo dia experimental de mucosite intestinal. Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar a real participação da citocina IL-1 β na mucosa intestinal dos animais sobreviventes da sepse submetidos à mucosite por irinotecano.

Em nosso estudo ficou evidenciado um aumento na dosagem da citocina IL-10 no intestino de animais sobreviventes da sepse grave que receberam irinotecano em detrimento daqueles que passaram apenas pelo procedimento cirúrgico (controle irinotecano) e pelo mesmo protocolo de tratamento quimioterápico. Essa importante diferença foi observada no jejuno e no íleo de camundongos avaliados no quinto dia experimental de mucosite intestinal e no íleo de animais no sétimo dia. Foi observado também que nas porções intestinais que apresentaram aumento dessa citocina anti-inflamatória também mostraram-se protegidas dos danos à mucosa intestinal causados pelo irinotecano, demonstrado através dos critérios histopatológicos propostos por WOO *et al.* (2000).

O papel desempenhado pela citocina IL-10 nas doenças inflamatórias do trato gastrointestinal vem sendo amplamente estudado (KUHN *et al.*, 1993; MUNOZ *et al.*, 2012; WIRTZ; NEURATH, 2007). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória conhecida supressora de células Th1 e da função de macrófagos efetores, que é capaz de inibir tanto a apresentação de antígenos como a posterior liberação de citocinas pró-inflamatórias, atenuando assim a inflamação em doenças inflamatórias intestinais (MUNOZ *et al.*, 2012). Foi também demonstrado que uma inativação de IL-10, através da utilização de um anticorpo anti-IL-10, em animais resulta em um aumento de IL-12 e IFN- γ (RENNICK; FORT, 2000). Além disso, foi também evidenciado que na mucosa intestinal de pacientes com Doença de Crohn detectou-se baixos níveis de IL-10 (SCHREIBER *et al.*, 1995).

Em um estudo de Kuhn *et al.* (1993) foi demonstrado que camundongos com deleção do gene da citocina IL-10 (IL-10^{-/-}) desenvolvem espontaneamente a enterocolite crônica e apresentam crescimento retardado, com infiltração massiva de linfócitos, macrófagos e neutrófilos ativados na mucosa intestinal e mostram alterações no intestino com intensa hiperplasia da mucosa. O desenvolvimento espontâneo da enterocolite crônica em animais (IL-10^{-/-}) relaciona-se ao fato de que a superfície da mucosa intestinal estar exposta a elevadas concentrações de antígenos derivados dos alimentos e dos microorganismos, conduzindo a uma contínua estimulação do sistema imune. Em contraste, os animais com genes deletados para IL-10 sob as mesmas condições, mas que são matados somente em condições SPF

(animais livres de patógenos específicos), desenvolveram apenas uma inflamação local limitada ao cólon proximal.

Para os autores, estes resultados indicam que a inflamação do intestino nos animais com genes deletados para IL-10 se origina a partir de respostas imunes descontroladas estimuladas por antígenos entéricos, e que a IL-10 é um elemento essencial imunoregulador no trato gastrointestinal. Levando-se em conta que a IL-10 é um potente supressor da síntese de citocinas por macrófagos, células NK e células T, foi sugerido que o defeito primário na produção de IL-10 seja responsável pela incapacidade de controlar as respostas imunes intestinais normais contra antígenos entéricos, levando a uma inflamação crônica por uma contínua síntese de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α , IL-1, ou IFN- γ . Além disso, foi também demonstrado nesse trabalho que a administração contínua de IL-10 em camundongos geneticamente modificados pode transitoriamente curar sua doença (KUHN *et al.*, 1993).

Gao *et al.* (2012) demonstraram o papel da citocina IL-10 em regular a função celular intestinal. Os autores desse estudo visualizaram um aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 bem como da expressão do seu mRNA quando da utilização do probiótico *Clostridium butyricum* em cultura de enterócitos. Ficou demonstrado pelo mesmo trabalho que a utilização de um anticorpo anti IL-10 nessas culturas resultou em significativa degradação da proteína citoplasmática I κ B, aumento do fator de transcrição NF- κ B e aumento nos níveis de IL-8 no sobrenadante. Além disso, um aumento significativo de células apoptóticas e necróticas tratadas com anticorpo anti-IL-10 ficou evidenciado. Estes resultados indicam que a neutralização de IL-10 pode induzir a uma excessiva resposta imune e até mesmo a morte celular em enterócitos.

Como descrito anteriormente, no nosso estudo foi observado um importante aumento dos níveis teciduais de IL-10 em animais sobreviventes de sepse grave que receberam irinotecano. Além da importante melhora das alterações morfométricas e inflamatórias e da diarreia associadas à mucosite intestinal induzida pelo irinotecano nesses animais. Deste modo, o presente trabalho nos permite sugerir que, possivelmente essa proteção dos danos à mucosa causados pelo quimioterápico poderia estar ocorrendo, pelo menos em parte, pela presença de níveis aumentados desta citocina anti-inflamatória.

Os mecanismos que cursam com o desenvolvimento da mucosite intestinal por irinotecano ainda não estão totalmente elucidados. Deste modo, aprofundar o estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese desta é de suma importância. Neste trabalho, uma possível participação da IL-10 contribuindo para uma atenuação da mucosite

intestinal ainda merece investigações adicionais. A utilização de animais sobreviventes de sepse grave pode, portanto torna-se uma ferramenta interessante para a demonstração do papel de IL-10 e de outras citocinas associadas ao perfil de macrófagos M2, na patogênese da mucosite intestinal consequente ao uso de irinotecano.

8 CONCLUSÃO

O controle da sepse polimicrobiana grave leva a uma atenuação significativa dos parâmetros inflamatórios nos animais expostos ao irinotecano, como diarreia, perda de peso, inflamação e perda da integridade da arquitetura no tecido intestinal. Tal efeito parece ser consequente, entre outros ainda não estudados, ao aumento de IL-10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIGERGES, D.; ARMAND, J. P.; CHABOT, G. G.; DA COSTA, L.; FADEL, E.; COTE, C.; HERAIT, P.; GANDIA, D. Irinotecan (CPT-11) high-dose escalation using intensive high-dose loperamide to control diarrhea. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 86, p. 446-9. 1994.
- ALIMONTI, A.; GELIBTER, A.; PAVESE, I.; SATTA, F.; COGNETTI, F.; FERRETTI, G.; RASIO, D.; VECCHIONE, A.; PALMA M D. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer. Treat. Rev.**, v. 30, p. 555-562. 2004.
- ALVES-FILHO, J. C.; FREITAS, A.; RUSSO, M.; CUNHA, F. Q. Toll-like receptor 4 signaling impairs neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 461-470. 2006.
- ALVES-FILHO, J. C.; SONEGO, F.; SOUTO, F. O.; FREITAS, A.; VERRI JUNIOR, W. A.; AUXILIADORA-MARTINS, M.; BASILE-FILHO, A.; MCKENZIE, A. N.; XU, D.; CUNHA, F. Q.; LIEW, F. Y. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nat Med.**, v. 16, p. 708-713. 2010.
- ANGUS, D. C.; CARLET, J. Surviving intensive care: a report from the 2002 Brussels Roundtable. **Intensive Care Med.**, v. 29, p. 368-377. 2003.
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe Sepsis and Septic Shock. **N Engl J Med.**, v. 369, p. 840-851, 2013.
- ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med.**, v. 29, p. 109-116, 2001.
- APOSTOLIDOU, E.; ESTEY, E.; CORTES, J.; GARCIA-MANERO, G.; FADERL, S.; THOMAS, D.; TSIMBERIDOU, A.; KANTARIJIAN, H.; GILES, F. J. Mitoxantrone and prolonged infusion gemcitabine as salvage therapy in patients with acute myelogenous leukemia. **Leuk. Res.**, v. 27, n. 4, p. 301-304. 2003.
- AZEVEDO, O.G.P. **Mecanismo anti-inflamatório do peptídeo mimético da apolipoproteína E (COG 133) na recuperação da mucosite intestinal induzida por 5-fluoruracil em camundongos Swiss.** 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 214-223, 2000.
- BENJAMIM, C. F.; LUNDY, S. K.; LUKACS, N. W.; HOGABOAM, C. M.; KUNKEL, S. L. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. **Blood**, v. 105, p. 3588-3595, 2005.
- BENJAMIM, C. F.; SILVA, J. S.; FORTES, Z. B.; OLIVEIRA, M. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect Immun.**, v. 70, p. 3602-3610, 2002.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. Sepsis and cytokines: a current status. **Br. J. Anaesth.**, v. 77, p. 110-117, 1996.

BLEIBERG, H.; CVITKOVIC, E. Characterization and clinical management of CPT-11 (Irinotecan)-induced adverse events: The European perspective. **Eur. J. Cancer**, v. 32, p. 18–23, 1996.

BLEIBERG, H. CPT-11 in gastrointestinal cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 35, p. 371-379, 1999.

BOEHMER, C. H.; JAEGER, W. Capecitabine in treatment of platinum-resistant recurrent ovarian cancer. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 1A, p. 439-43, 2002.

BOKEMEYER, C.; HARTMANN, J. T. Oral and gastrointestinal toxicity. In: LIPP, H. P. **Anticancer drug toxicity: prevention, management and clinical pharmacokinetics**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap. 4, p. 235-261.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, p. 1644-1655, 1992.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, p. 235-243, 1997.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann. Intern. Med.**, v. 115, p. 457-469, 1991.

CALABRESI, E. J. Nitric oxide: biphasic dose responses. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 31, p. 489-501, 2001.

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. 1040-1093.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; ORIA, R. B.; WOOD REA, K.; BRITO, G. A. C.; FUJI, J.; OBRIG, T.; LIMA, A. A.; GUERRANT, R. L. Alanyl-glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Nutrition**, v. 20, n.10, p.934- 941, 2004b.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, I.P.; ARAUJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G.H.; BRITO, G. A.; LIMA, V.; MONTEIRO, S. M.; SANTOS, F. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Digest. Dis. Sci.**, v. 49, p. 65-72, 2004a.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.**, v.70, p. 369, 2001.

COSTA, M. L. V.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; ARAGÃO, K. S.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; AS, L. G.; LEITE, L. L.; NUNES, L. G.; BRITO, G. A. C.; SOUZA, M. H. L. P.; ALMEIDA, P. R. C.; RIBEIRO, R. A. Chemotherapy-associated steatohepatitis induced by irinotecan: a novel animal model. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 1, p. 1-1, 2013.

CROSARA-ALBERTO, D. P.; DARINI, A. L.; INOUE, R. Y.; SILVA, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. **Br J Pharmacol.**, v. 136, p. 645-658, 2002.

DAVIES, M. G.; HAGEN, P. O. Systemic inflammatory response syndrome. **British Journal of Surgery**, v. 84, p. 920-935, 1997.

DODDS, H. M.; HANRAHAN, J.; RIVORY, L. R. The inhibition of acetylcholinesterase by irinotecan and related camptothecins: key structural properties and experimental variables. **Anticancer Drug Des.**, v. 16, n. 4-5, p. 239-246, 2001.

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

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S.; STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, p. 2868-2878, 2009.

DUNCAN, M.; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 18, p. 853-874, 2003.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of the diarrhea. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 931-43, 2003.

FIGUEIREDO, A. A. **Efeito do anticorpo anti-TNF- α , infliximabe, sobre a mucosite intestinal experimental induzida por Irinotecano.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

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

FRIEDMAN, G.; JANKOWSKI, S.; MARCHANT, A.; GOLDMAN, M.; KAHN, R. J.; VINCENT, J. L. Blood interleukin-10 levels parallel the severity of septic shock. **J. Crit. Care**, v. 12, p. 183-187, 1997.

FUJISHIMA, S.; AIKAWA, N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. **Intensive Care Med.**, v. 21, p. 277-285, 1995.

GANDIA, D.; ABIGERGES, D.; ARMAND, J. P.; CHABOT, G.; DA COSTA, L.; DE FORNI, M.; MATHIEU-BOUE, A.; HERAIT, P. CPT-11-induced cholinergic effects in cancer patients (letter). **J. Clin. Oncol.**, v. 11, p. 196-197, 1993.

GAO, Q.; QI, L.; WU, T.; WANG, J. An important role of interleukin-10 in counteracting excessive immune response in HT-29 cells exposed to *Clostridium butyricum*.

BMC Microbiol., v. 12, p.1-8, 2012.

GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; INGLIS, M. R. B.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 18, p. 1095-100, 2003.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K.; CLARKE, J. M.; REGESTER, G. O.; THOMPSON, F. M.; GOLAND, G. J.; EDWARDS, B. G.; CUMMINS, A. G. The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 50, p. 53-58, 2002.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer**, v. 14, n. 9, p. 890-900, 2006.

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

GUICHARD, S.; HENNEBELLE, I.; BUGAT, R. Cellular interaction of 5-fluorouracil and the camptothecin analogue CPT-11(irinotecano) in human colorectal carcinoma cell line. **Bioc. Pharmacol.**, v. 55, p. 667-676, 1998.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 138-150, 2003.

HOTCHKISS, R. S. *et al.* Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. **J. Immunol.**, v. 166, p. 6952-63, 2001.

IKEGAMI, T.; HA, L.; ARIMORI, K.; LATHAM, P.; KOBAYASHI, K.; CERYAK, S.; MATSUZAKI, Y.; BOUSCAREL, B. Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. **Cancer Res.**, v. 62, n. 1, p. 179-187, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

JANSMAN, F. G.; SLEIJFER, D. T.; DE GRAAF, J. C.; COENEN, J. L.; BROUWERS, J. R. Management of chemotherapy-induced adverse effects in the treatment of colorectal cancer. **Drug Saf.**, v. 24, p. 353-367, 2001.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **Int. Care Med.**, v. 22, n. 2, p. 63- 72, 2007.

- KAUSS, I. A. M.; CINTIA, M. C.; GRION CARDOSO, L. T. Q.; ANAMI, E. H. T.; NUNES, L. B.; FERREIRA, G. L.; MATSUO, T.; BONAMETTI, A. M. An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units. Sepsis Brazil study. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 14, p. 264-270, 2010.
- KAWATO, Y.; AONUMA, M.; HIROTA, Y.; KUGA, H.; SATO, K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. **Cancer Res.**, v. 51, p. 4187- 4191, 1991.
- KEHRER, D. F.; SPARREBOOM, A.; VERWEIJ, J.; DE BRUIJN, P.; NIEROP, C. A.; VAN DE SCHRAAF, J.; RUIJGROK, E. J.; DE JONGE, M. J. Modulation of irinotecan-induced diarrhea by cotreatment with neomycin in cancer patients. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, p. 1136-1141, 2001.
- KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell.**, v. 75, p. 263-274, 1993.
- LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B.; BRAGA-NETO, M. B.; BELLAGUARDA, E. A. L.; SILVA, J. V.; GOMES, A. S.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; SIQUEIRA, F. J. W. S.; FREIRE, R. S.; VALE, M. L.; RIBEIRO, R. A. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterology**, v. 11, p. 1-10, 2011.
- LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; LIRA, A. M. S.; SILVA, L. R.; BELLAGUARDA, E. A. L.; MACEDO, F. D. B.; SOUSA, R. B.; BRITO, G. A. C. Glutamine and alanyl-glutamine accelerate the recovery from 5-Fluorouracil-induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 61, p. 215–222, 2008.
- LEITÃO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A.; MACEDO, F. D.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p. 603-12, 2007.
- LEVITZKI, A.; KLEIN, S. Signal transduction therapy of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 31, n. 4, 2010.
- LIAN, P. C. *et al.* Patients with severe sepsis vary markedly in their ability to generate activated protein C. **Blood**, v. 104, p. 3958-64, 2004.
- LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; FREITAS, H. C.; WONG, D. V. T.; WANDERLEY, C. W. S.; NUNES, L. G.; LEITE, L. L.; MIRANDA, S. P.; SOUZA, M. H. L. P.; BRITO, G. A. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Br J. Pharmacol.**, v.171, p. 2335–2350, 2014.
- LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; FIGUEIREDO, A. A.; FREITAS, H. C.; MELO, M. L. P.; WONG, D. V. T.; LEITE, C. A. V. G.; MEDEIROS, R. P.; MARQUES-NETO, R. D.; VALE, M. L.; BRITO, G. A. C.; ORIÁ, R. B.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of Nitric Oxide on the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis:

Role of Cytokines on Inducible Nitric Oxide Synthase Activation. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 69, p. 931-942, 2012.

LIMA-JUNIOR, R. C. **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. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LOGAN, R. M.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; STRINGER, A. M.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 62, p. 33-41, 2008.

MACEDO, F. Y.; MOURÃO, L. T.; FREITAS, H. C.; LIMA, R. C. J.; WONG, D. V.; ORIA, R. B.; VALE, M. L.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Interleukin-4 modulates the inflammatory response in ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis. **Inflammation.**, v. 35, n. 1, p.297-307, 2012.

MARCHANT, A.; DEVIERE, J.; BYL, B.; DE GROOTE, D.; VINCENT, J.; GOLDMAN, M. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 296-301, 1995.

MCCOUBREY, W. K. J.; EWING, J. F.; MAINES, M. D. Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 295, p. 13-20, 1992.

MCCOUBREY, W. K. J.; HUANG, T. J.; MAINES, M. D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. **Eur. J. Biochem.**, v. 247, p. 725-732, 1997.

MELO, M. L. P.; BRITO, G. A. C.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B. L.; SILVA, J. V.; SOARES, P. M. G.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H. L. P.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Role of cytokines (TNF- α , IL-1 β and KC) in the pathogenesis of CPT-11 induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 61, p. 775-784, 2008.

MULLANGI, R.; AHLAWAT, P.; SRINIVAS, N. R. Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. **Biomed. Chromatogr.**, v. 24, p. 104-123, 2010.

NAKAMURA, Y.; ARAMAKI, Y.; KAKIUCHI, T. A mouse model for postoperative fatal enteritis due to Staphylococcus infection. **J. Surg. Res.**, v. 96, p. 35-43, 2001.

NASCIMENTO, D.C.; ALVES-FILHO, J. C.; SONEGO, F.; FUKADA, S.Y.; PEREIRA, M.S.; BENJAMIM, C.; ZAMBONI, D. S.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 38, p. 1718-1725, 2010.

NISKANEN, M. *et al.* Sobrevida de pacientes pós-sepse comparados à população geral e a pacientes de UTI. **Critical Care Medicine**, v. 24, n. 12, p. 1962-67, 1996.

O'LEARY, J.; MUGGIA, F. M. Camptothecins: A review of their development and schedules of administration. **Eur. J. Cancer**, v. 34, p. 1500-1508, 1998.

ORAZI, A. *et al.* Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation. **Lab Invest.**, v.75, p.33-42, 1996.

OSUCHOWSKI, M. F.; WELCH, K.; SIDDIQUI, J.; REMICK, D. G. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the sirs/cars continuum in sepsis and predict mortality. **J. Immunol.**, v. 177, p. 1967-1974, 2006.

PARRILLO, J. E.; PARKER, M. M.; NATANSON, C. Septic shock in humans, advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. **Ann. Intern. Med.**, v. 113, p. 227-40, 1990.

PEREIRA, V. B. M. **Novo modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-fluorouracil em camundongos C57BL/6**. 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

PERL, T. M.; DVORAK, L.; HWANG, T.; WENZEL, R. P. Long-term survival and function after suspected gram-negative sepsis. **Jama**, v. 274, p. 338-345, 1995.

PINSKY, M. R.; VINCENT, J. L.; DEVIERE, J. Serum cytokine levels in human septic shock: relation to multiple-system organ dysfunction and mortality. **Chest.**, v. 103, p. 565-575, 1993.

PISANO, C.; MORABITO, A.; SORIO, R.; BREDI, E.; LAURIA, R.; GEBBIA, V.; SCALTRITI, L.; SCALONE, S.; ZANONEL, V.; GREGGI, S.; BENEDEUCE, G.; LOSITO, S.; GALLO, C.; DI MAIO, M.; FORESTIERI, V.; PIGNATA, S. A phase II study of capecitabine in the treatment of ovarian cancer resistant or refractory to platinum therapy: a multicentre Italian trial in ovarian cancer (MITO-6) trial. **Can. Chem. Pharmacol.**, v. 64, p. 1021-1027, 2009.

PRUITT, J. H.; EDWARDS, P. D.; HARWARD, R. R. S. Soluble interleukin-1 type-II receptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis syndrome. **Blood**, v. 87, p. 3282-8, 1996.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Arch. Med. Res.**, v. 36, p. 672-68, 2005.

RENNICK, D. M.; FORT, M. M. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 278, p. 829-833, 2000.

RICTTIRSCH, D.; HOESEL, M. L.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human. **J. Leukoc. Biology.**, v. 81, p. 137-143, 2007.

RIEDEMANN, N. C.; GUO, R. F.; WARD, P. A. The enigma of sepsis. **J. Clin. Invest.**, v.112, p. 460-467, 2003.

RIVORY, L. P.; BOWLES, M. R.; ROBERT, J.; POND, S. M. Conversion of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hidroxicamptothecin (SN 38), by human liver carboxylesterase. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, n. 7, p. 1103-1111, 1996.

ROTHENBERG, M. L. Topoisomerase I inhibitors: Review and update. **Ann. Oncol.**, v. 8, p. 837-855, 1997.

RUBENSTEIN, E. B.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.; EPSTEIN, J.; ELTING, L. S.; FOX, P. C.; COOKSLEY, C.; SONIS, S. T. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100 suppl 9, p. 2026-2046, 2004.

RUSSEL, J. A. Management of sepsis. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.

SALIBA, F.; HAGIPANTELLI, R.; MISSET, J. L.; BASTIAN, G.; VASSAL, G.; BONNAY, M.; HERAIT, P.; COTE, C.; MAHJOUBI, M.; MIGNARD, D.; CVITKOVIC, E. Pathophysiology and therapy of irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with advanced colorectal cancer: a prospective assessment. **J. Clin. Oncol.**, v. 16, n. 8, p. 2745-2751, 1998.

SALTZ, L. B.; COX, J. V.; BLANKE, C.; ROSEN, L. S.; FEHRENBACHER, L.; MOORE, M. J.; MAROUN, J.A.; ACKLAND, S.P.; LOCKER, P.K.; PIROTTA, N.; ELFRING, G.L.; MILLER, L. L. Irinotecan plus Fluorouracil and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, p. 905-914, 2000.

SILVA, E. *et al.* Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, p. R251, 2004.

SIQUEIRA-BATISTA, R. *et al.* Sepsis: atualidades e perspectivas. **Ver. Bras. Ter. Intensiva.**, v. 23, p. 207-16, 2011.

SOARES, P. M. G.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; MOTA, J. M. S.; JUSTINO, P. F. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. L. P. Role of Platelet activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 68, p. 713-720, 2011b.

SOARES, P. M. G.; LOPES, L. O.; MOTA, J. M. S. C.; BELARMINO FILHO, J. N.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Methotrexate-induced intestinal mucositis delays gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 48, p. 80-85, 2011a.

SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M. S. C.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; BRITO, G. A. C.; SANTOS, A. A.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 63, p. 91-98, 2008.

SOARES, P. M. G.; MOTA, J. M.; SOUZA, E. P.; JUSTINO, P. F.; FRANCO, A. X.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine.**, v. 61, p. 46–49, 2013.

SOARES, P. M.; LIMA-JUNIOR, R. C.; MOTA, J. M.; JUSTINO, P. F.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; SOUZA, M. H. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 68, n. 3, p. 713-720, 2011.

SONIS, S. T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, B. N.; RABER-DURLACHER, J.; DONELLY, J. P.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, v. 100, supl. 9, p. 1995-2025, 2004.

SONIS, S. T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 39–43, 1998.

_____. The pathobiology of mucositis. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 4, n. 4, p. 277–284, 2004.

SWEET, M. J.; HUME, D. A. Endotoxin signal transduction in macrophages. **J. Leukoc Biol.**, v. 60, p. 8-26, 1996.

SYMONDS, R. P. Treatment-induced mucositis: an old problem with new remedies. **Br J. Cancer**, v. 77, p.1689–95, 1998.

TAKAHASHI, H.; YASUHIRO, T.; TAKEUCHI, D.; KOBAYASHI, M.; HERNDON, D. N.; SUZUKI, F. Influence of systemic inflammatory response syndrome on host resistance against bacterial infections. **Crit. Care Med.**, v. 32, p. 1879-1885, 2004.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; HIROHASHI, M.; KATO, M.; NOMURA, M.; NAGAI, E.; YOKOI, T.; KAMATAKI, T. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res.**, v. 56, p. 3752-7, 1996.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 335-376, 2003.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. **J. Immunol.**, v. 165, p. 5392-5396, 2000.

TAVARES-MURTA, B. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. 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. 1369-74, 1998.

TAVARES-MURTA, B. M.; MACHADO, J. S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Nitric oxide mediates the inhibition of neutrophil migration induced by systemic administration of LPS. **Inflammation**, v.25, p. 247-253, 2001.

VAN CUTSEM, E. *et al.* Clinical benefit of irinotecan (CPT-11) in metastatic colorectal cancer resistant to 5-FU. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 16, p. 268a, 1997.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect Dis.**, v. 8, p. 32-43, 2008.

VAN ZEE, K. J.; KOHNO, T.; FISCHER, E.; ROCK, C. S.; MOLDAWER, L. L.; LOWRY, S. F. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 4845-9, 1992.

VANHOEFER, U.; HARSTRICK, A.; ACHTERRATH, W.; CAO, S.; SEEBER, S.; RUSTUM, Y. M. Irinotecan in the Treatment of Colorectal Cancer: Clinical Overview. **Journal of Clinical Oncology**, n. 19, p. 1501-1518, 2001.

VENET, F.; CHUNG, C. S.; MONNERET, G.; HUANG, X.; HORMER, B.; GARBER, M.; AYALA, A. Regulatory T cells populations in sepsis and Trauma. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, p. 1-13, 2007.

VERDRENGH, M.; TARKOWSKI, A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by Staphylococcus aureus. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2517-2521, 1997.

VIELE, C. S. Overview of chemotherapy-induced diarrhea. **Seminars in oncology nursing**, v. 19, supl. 3, p. 2-5, 2003.

VINCENT, J. L.; ZHANG, H.; SZABO, C.; PREISER, J. C. Effects of nitric oxide in septic shock. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, n. 161, p. 1781-1785, 2000.

VINCENT, J. L. *et al.* International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA**, n. 302, p. 2323-9, 2009.

WILLIAMS, D. A. Inflammatory cytokines and mucosal injury. **JNCI Monographs**, v. 2001, p. 26-30, 2001.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. 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. 3888-90, 1966.

WANG, J. C. Review: DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 635-92, 1996.

WEYCKER, D.; AKHRAS, K. S.; EDELSBERG, J.; ANGUS, D. C.; OSTER, G. Long-term mortality and medical care charges in patients with severe sepsis. **Crit. Care Med.**, v. 31, n. 9, p. 2316-23, 2003.

WIRTZ, S.; NEURATH, M. F. Mouse models of inflammatory bowel disease. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, v. 59, p. 1073-1083, 2007.

WONG, D.V.T. **Estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano e seu metabólito ativo, SN-38: envolvimento dos receptores**

TLR2, NOD1 e da proteína adaptadora MyD88. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

WOO, P. C.; NG, W. F.; LEUNG, H. C.; TSOI, H. W.; YUEN, K. Y. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 41, n. 5, p. 527-532, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 19 fev. 2013.

XIANG, D.; GUO, Y.; ZHANG, J.; GAO, J.; LU, H.; ZHU, S.; WU, M.; YU, Y.; HAN, W. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates cyclophosphamide induced mucositis in a murine model. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 67, p. 1445–1453, 2011.

XU, J.; ZHANG, X.; PELAYO, R.; MONESTIER, M.; AMMOLLO, C. T.; SEMERARO, F.; ESMON, C. T. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. **Nat. Med.**, v. 15, p. 1318-1321, 2009.