



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

DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG

**MEDIAÇÃO DOS RECEPTORES TLR2, NOD1 E DA PROTEÍNA ADAPTADORA
MyD88 NA MODULAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO
IRINOTECANO**

FORTALEZA

2013

DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG

**MEDIAÇÃO DOS RECEPTORES TLR2, NOD1 E DA PROTEÍNA ADAPTADORA
MyD88 NA MODULAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO
IRINOTECANO**

Tese 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 Doutor em Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA

2013

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

W852m Wong, Deysi Viviana Tenazoa

Mediação dos receptores TLR2, NOD1 e da proteína adaptadora MyD88 na modulação da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano. – 2013.

197f.; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

1. Camptotecina. 2. Mucosite. 3. Receptores Toll-Like. 4. Proteína Adaptadora de Sinalização NOD1. I. Título

CDD: 616.994341

DEYSI VIVIANA TENAZOA WONG

**MEDIAÇÃO DOS RECEPTORES TLR2, NOD1 E DA PROTEÍNA ADAPTADORA
MyD88 NA MODULAÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO
IRINOTECANO**

Tese 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 Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: **11 de Abril de 2013.**

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Sara Maria Thomazzi
Universidade de Sergipe (UFS)

Prof. Dr. Markus Andret Cavalcante Gifoni
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

Dedico esta tese à instituição que é a base da minha vida: **minha família**

Em especial a duas pessoas que dão sentido a minha vida...Ao meu amado esposo **Roberto César**, por ser meu companheiro e parceiro de todas as horas, meu grande estimulador e que junto a ele conhece o significado da palavra felicidade. E a nossa filha muito amada **Letícia**, que veio iluminar e alegrar à minha vida e por ser minha fonte de superação.....AMO MUITO VOCÊS!

Aos meus pais, **Jenny & Adolfo**, pelo amor imensurável e fizeram de mim o que hoje eu sou, pelo exemplo de dedicação e trabalho que são minha referência para alcançar meus objetivos. Está conquista devo muito a eles. Aos meus irmãos **Lizeth** e **Anthony**, pelo amor e pelo incentivo constante nos momentos de saudade.

*Agradeço de forma especial a **Deus** e a **Nossa Senhora** por sempre guiarem meu caminho e pelas maravilhas feitas na minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro**, por ter acreditado em mim e pelo exemplo de competência e amor ao que faz. Além da paciência e dedicação. Não tenho palavras para agradecer as horas dispensadas na orientação e leitura minuciosa deste trabalho, minha sincera gratidão!

Ao Prof. **Fernando de Queiróz Cunha** pela presteza, disponibilidade e por me receber com tanta satisfação em seu laboratório na FMRP/USP, permitindo o desenvolvimento deste trabalho de grande qualidade.

Ao Prof. **Aldo Ângelo Moreira Lima**, pela presteza e colaboração para realizar os experimentos de permeabilidade e perfusão intestinal, e pelas importantes contribuições realizadas para o trabalho.

À Profa. **Gerly Anne de Castro Brito**, pelas imprescindíveis análises histopatológicas realizadas neste trabalho, e por ser um exemplo de mãe e de profissional a ser seguido.

À Profa. **Cibele Barreto Mano de Carvalho**, pelo suporte na realização dos ensaios microbiológicos desse trabalho, além das importantes contribuições realizadas no exame de qualificação.

À Profa. **Mariana Vale** e ao Prof. **Marcellus Loiola Souza**, pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Aos alunos de Iniciação científica, **Amanda Couto** e **Edwyn Lowisi**, pela ajuda preciosa durante a execução deste trabalho, pois essa foi essencial para a conclusão do doutorado.

Ao amigo e mestrando **Caio Abner**, pela inestimável ajuda na confecção de belas ilustrações apresentadas nesse trabalho, além da valiosa ajuda dedicada nos experimentos de alça isolada. Por ser exemplo de competência.

Ao amigo e mestrando **Carlos Wagner**, pelas discussões empolgadas e pela ajuda brindada durante as dosagens dos experimentos.

A todos os amigos do LAFICA, especialmente **Aline Figueredo**, **Ana Carla Silva**, **Ana Paula Macêdo**, **Anielle Torres**, **Carlos Wagner**, **Caio Abner**, **Eudmar Marcolino**,

Larisse Lucetti, Lus Mario, Livia Talita e Karoline Aragão pelo agradável convívio e momentos de amizade compartilhados durante esta jornada.

Às amigas **Rosemayre Freire, Aline Figuerido, Ana Paula, Larisse e Ana Carla**, pela amizade e ajuda brindada durante os momentos que precisei.

As técnicas **Vandinha França Pinheiro, Karina Felismino** (LAFICA) e **Socorro França** (morfologia) pela competência, organização e pelos excelentes profissionais que são.

Aos alunos de Iniciação científica, **Lorena Granja, Leandro Linhares e José Noronha**, pela ajuda durante a realização dos experimentos de permeabilidade e perfusão.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia e Dor da USP-FMRP, em especial a **Vanessa Borges e Fabricio Souto**, pela inestimável ajuda na execução deste trabalho e pela acolhida nessa maravilhosa cidade.

Aos técnicos **Ana Kátia dos Santos, Diva Amábile, Giuliana Bertozi, Ieda Regina Schivo, Júlio Anselmo, Sérgio Roberto Rosa, Tadeu Vieira**, todos da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto pelo suporte experimental e pelo companheirismo no tempo que passei nessa cidade.

Aos amigos de Ribeirão Preto, **Alexander Kanashiro, Andressa, Cristina Setim, Flavia, Fabiane Sonogo, Fernanda Castanheira, Larissa, Miriam, Paula Czaikoski, Rafael Poloni, Rafael Ferreira, Talita e Vanessa Borges**, pela acolhida, companheirismo e pelos momentos agradáveis compartilhados durante meu estágio de doutorado.

Aos **Professores da Pós-Graduação em Farmacologia** pelos ensinamentos e aperfeiçoamento científico. Em especial ao **Prof. Vietla Rao** e **Profa. Nylane** pelas importantes contribuições realizadas durante o exame de qualificação.

Aos meus sogros **Roberto e Aureana**, pela valiosa força dedicada ao cuidado da minha princesa durante os momentos de ausência, minha eterna gratidão, e por serem exemplos de amor e dedicação à família. Aos meus cunhados **Marina e Dennis**, pela torcida e carinho que recebe desde o início.

Ao meu tio **Henry Wong**, meu segundo Pai, por todo o amor e estímulo de sempre, por acreditar em mim, pela ajuda na conquista deste sonho e pelo exemplo de determinação na vida.

As minhas amigas **Cinthya Iamile, Silveria Lira, Kristiana Mousinho**, pela grande amizade, pela acolhida que recebi de vocês quando cheguei no Brasil e pelos momentos inesquecíveis que compartilhamos juntas. Vocês são amigas para a vida toda!

Às secretárias da Pós-graduação **Aura Rhanes Yida e Márcia Borges** pela atenção e gentileza com que sempre me atenderam quaisquer que fossem minhas necessidades em relação à pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: **Haroldo, Fernando, Joana, Alana**, pela indispensável ajuda na manutenção das atividades do departamento.

Ao **CNPq, CAPES e FUNCAP** pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho, em especial ao **CNPq** pela concessão da bolsa de doutorado.

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

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais prevalentes em todo o mundo, sendo uma das principais causas de óbito por câncer. Dentre as drogas utilizadas como primeira linha no tratamento do CCR e do CCR metastático hepático, o irinotecano apresenta destaque pelo impacto sobre o aumento da sobrevida dos pacientes. Contudo, o surgimento de efeitos colaterais associados ao irinotecano (IRI), como a mucosite intestinal (MI), tem impactado negativamente no curso terapêutico do paciente, observando-se atrasos nos ciclos subsequentes de quimioterapia, redução de doses e, por vezes, interrupção do tratamento. A MI e a diarreia grave são efeitos colaterais frequentes que pode atingir de 15-25% dos pacientes em quimioterapia. **Objetivos:** Estudar os parâmetros funcionais da barreira intestinal e os mecanismos envolvidos na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano e seu metabólito ativo, SN-38. **Métodos:** Camundongos C57BL/6 machos (WT), 20-25g, foram divididos em grupos (n=6-8), administrados por 4 dias com salina (5 mL/Kg, i.p) ou com irinotecano (IRI, 75 mg/Kg, i.p). Os animais foram analisados no 5º dia [D5] ou 7º dia [D7] quanto ao peso corpóreo, escores de diarreia, contagem de leucócitos. Após sacrifício, uma amostra de intestino foi coletada para dosagem de mieloperoxidase, análise histopatológica, morfométrica, e imunohistoquímica para TLR4. Adicionalmente, realizou-se o teste de permeabilidade e perfusão intestinal *in vivo*. Avaliou-se também a bacteremia e a translocação bacteriana em linfonodo mesentérico e fígado. Em adição, a participação de receptores Toll-like 2 (TLR2), 4 (TLR4) e 9 (TLR9) da proteína adaptadora MyD88 e NOD1 na mucosite intestinal foi verificada pelo uso de camundongos *knockout* com deleção gênica específica para aqueles receptores e seus respectivos camundongos selvagens (WT). Adicionalmente, realizou-se a avaliação dos efeitos *in vivo* e *in vitro* do SN-38. Os dados foram analisados com ANOVA/teste de Bonferroni ou Kruskal Wallis/teste de Dunn. $P < 0,05$ foi aceito. (Protocolo CEPA 99/10). **Resultados:** A injeção de IRI causou uma significativa ($P < 0,05$) perda ponderal, leucopenia e diarreia, associada a um aumento da infiltração de neutrófilos no jejuno, íleo e pulmão, com alterações morfométricas e uma intensa destruição da arquitetura dos vilos e criptas, apoptose celular em camundongos WT versus animais injetados com salina. Além disso, o IRI induz uma alteração da barreira intestinal evidenciada pela diminuição da excreção de lactulose, aliado a um aumento significativo ($P < 0,05$) da secreção intestinal de sódio, potássio e cloreto. Os camundongos injetados com Irinotecano apresentaram bacteremia e translocação bacteriana ($P < 0,05$) no linfonodo mesentérico e fígado, quando comparados ao grupo salina. A identificação bioquímica das bactérias translocadas evidenciou a presença de *Escherichia coli* (75%), *Citrobacter sp.* (17,2%), Bactérias Gram-Negativas Não-Fermentadoras e *Pseudomona aeruginosa* (18%) no grupo injetado com Irinotecano, aliado a um significativo aumento ($P < 0,05$) da imunomarcagem para TLR4 no intestino de animais injetados com IRI D5 (4[3-4]) e D7 (4[3-4]) versus o grupo salina (1,5[1-4]). Observamos que a deleção gênica para o receptor TLR2 e a proteína adaptadora MyD88, mas não para TLR4 ou TLR9, preveniram a perda ponderal e o dano funcional, relacionado aos eventos de diarreia, bem como as alterações morfométricas,

histopatológicas, infiltração de neutrófilos e bacteremia induzida pelo Irinotecano versus o grupo WT injetado com IRI ($P < 0,05$). Entretanto, a deficiência genética de NOD1 conferiu uma reduzida diarreia, sem reverter o dano pró-inflamatório induzido pelo IRI. Adicionalmente, o SN-38 causou um aumento da atividade de mieloperoxidase ($P < 0,05$), sem alterar a secreção intestinal na alça isolada de camundongos ($P > 0,05$) versus o grupo injetado com salina. O SN38 foi capaz de induzir alterações morfológicas nas células intestinais de ratos (IEC-6). **Conclusão:** O IRI induziu alteração dos parâmetros funcionais, detectadas pelo teste de permeabilidade e de perfusão intestinal. O IRI induziu uma bacteremia e translocação bacteriana para órgãos periféricos. Além disso, a deficiência do receptor Toll-like do tipo 2, e da proteína MyD88 previniu o dano intestinal e a diarreia induzida pelo IRI. Contudo, a deficiência de receptores NOD1 somente melhorou a diarreia. Adicionalmente, o SN38 foi associado a um aumento da infiltração de neutrófilo, sem alteração da secreção intestinal no modelo de alça isolada.

Palavras-chave: Camptotecina, Mucosite, Receptores Toll-like, Proteína adaptadora de sinalização NOD1.

ABSTRACT

The Colorectal Cancer (CRC) is one of the most prevalent neoplastic diseases in the world and is one leading cause of death. Irinotecan is a drug used as first line treatment for CRC and its liver metastases and has markedly improved the overall survival of patients. However, irinotecan-related side-effects, which include intestinal mucositis (IM), have impacted negatively on therapeutic outcome, leading to delayed chemotherapy cycles, dose reductions and treatment interruption. IM and life-threatening diarrhea may affect up to 15-25% of patients under irinotecan-based cancer chemotherapy regimens. **Aims:** To study the intestinal barrier function and the mechanisms involved in the IM induced by irinotecan and its active metabolite, SN-38. **Methods:** Male C57BL/6 mice (WT, n=6-8) were divided into groups and injected with saline (5 mL/kg, i.p.) or irinotecan (IRI, 75 mg/kg, i.p.) for 4 days. Body weight, diarrhea and blood leukocyte count were assessed on days 5 [D5] and 7 [D7]. Following euthanasia, intestinal samples were collected for histopathology, morphometry, mieloperoxidase and imunohistochemistry assays. In addition, in vivo intestinal permeability and perfusion tests were performed. Bacteremia and bacterial translocation to mesenteric lymph node and liver were further carried out. Additionally, the participation of toll-like receptors 2 (TLR2), 4 (TLR4) and 9 (TLR9), the adaptor protein MyD88 and NOD1 receptor in the pathogenesis of IM were investigated by the use of WT mice and knockout with target gene disruptions. Furthermore, the in vivo and in vitro effects of SN-38 were studied. Data analysis was performed with ANOVA/Bonferroni's test or Kruskal Wallis/Dunn's test. $P < 0,05$ was accepted. (CEPA 99/10). **Results.** IRI-injected WT mice presented a marked ($P < 0.05$) weight loss, leukopenia, diarrhea, increased neutrophil infiltration in lung, jejunum, ileum associated with villi and crypt morphologic alteration and apoptotic cell death versus saline-administered mice. Besides, reduced lactulose renal excretion, gut secretion of sodium, potassium and chloride evidenced intestinal barrier dysfunction in IRI-injected WT mice versus saline-administered control mice ($P < 0.05$). Bacteremia and bacterial translocation to mesenteric lymph node and liver were also observed in the IRI group. Biochemical identification of translocating bacteria revealed the presence of *Escherichia coli* (75%), *Citrobacter sp.* (17.2%), non-fermenting gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa* (18%) in blood samples of IRI-injected mice. In addition, an increased TLR4 immunexpression was detected in that group (IRI D5: 4[3-4] and D7: 4[3-4]) when compared with saline control (1.5[1-4]). Gene deletion to TLR2 and MyD88, but not to TLR4 or TLR9, prevented weight loss, diarrhea, intestinal morphometric alterations, neutrophil infiltration in the gut and bacteremia development versus the IRI-injected WT group ($P < 0.05$). However, NOD1 deletion was protective only against IRI-induced diarrhea without affecting the inflammatory infiltration. Furthermore, SN-38 promoted a marked neutrophil infiltration in ileum loops ($P < 0.05$) but did not induce intestinal secretion of liquids ($P > 0.05$) versus saline injected mice. Besides, cultured intestinal cells (IEC-6) incubated with SN-38 presented morphological changes in comparison to DMEM-cultured cells. **Conclusions:** IRI induced functional alterations in the gut and also bacteremia and bacterial translocation to peripheral organs. TLR2 and MyD88 deficiency prevented IRI-related intestinal damage and the diarrhea. However, NOD1 deficiency was protective only against diarrhea development. In

addition, SN-38 might be responsible for the intestinal inflammatory reaction without affecting gut secretion of liquids.

Keywords: Camptothecin, Mucositis, Toll-like Receptors, Nod1 Signaling adaptor protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas da Camptotecina, Topotecano, Irinotecano e SN38.....	30
Figura 2 - Metabolismo do Irinotecano.....	32
Figura 3 - Detalhes estruturais de produtos do metabolito do irinotecano.....	33
Figura 4 - Estrutura do intestino.....	38
Figura 5 - Fases da diarreia associada ao Irinotecano.....	41
Figura 6 - Transporte através do epitélio intestinal.....	43
Figura 7 - Mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal por Irinotecano.....	48
Figura 8 - Ligantes específicos para receptores Toll-like.....	50
Figura 9 - Via de Sinalização dos Receptores Toll-like.....	53
Figura 10 - Via de Sinalização do Receptor NOD1.....	57
Figura 11 - Esquema de Indução da Mucosite Intestinal.....	65
Figura 12 - Avaliação dos escores de diarreia pós-injeção do Irinotecano em camundongos C57BL/6.....	66
Figura 13 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de massa corpórea em função do tempo.....	83
Figura 14 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos C57BL/6.....	84
Figura 15 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos C57BL/6.....	85
Figura 16 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica em segmentos intestinais.....	86
Figura 17 - Fotomicrografias de amostras de duodeno após a injeção do irinotecano em camundongos C57BL/6.....	87

Figura 18 - Fotomicrografias de amostras de jejuno após a injeção do irinotecano em camundongos C57BL/6.....	88
Figura 19 - Fotomicrografias de amostras de íleo após a injeção do irinotecano em camundongos C57BL/6.....	89
Figura 20 - Fotomicrografias de amostras de cólon após a injeção do irinotecano em camundongos C57BL/6.....	91
Figura 21 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores histopatológicos do cólon em camundongos C57BL/6.....	92
Figura 22- Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais e pulmão de camundongos C57BL/6.....	93
Figura 23 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a excreção urinária de lactulose e manitol em camundongos C57BL/6.....	96
Figura 24 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a razão lactulose/manitol em camundongos C57BL/6.....	97
Figura 25 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a secreção intestinal de sódio, potássio e cloreto em camundongos submetidos à perfusão intestinal.....	98
Figura 26 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a concentração plasmática de ureia e creatinina.....	99
Figura 27 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue.....	101
Figura 28 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no linfonodo mesentérico e o fígado.....	102
Figura 29 - Imunomarcção do receptor Toll-like-4 (TLR4) em amostras de intestino de camundongos injetados com irinotecano.....	104
Figura 30 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de imunomarcção do receptor Toll-like 4 (TLR4) em amostras intestinais de camundongos.....	105
Figura 31 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso em camundongos MyD88 ^{-/-} em função do tempo.....	108
Figura 32 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos Myd88 ^{-/-}	109
Figura 33 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica em amostras de jejuno de camundongos Myd88 ^{-/-}	110

Figura 34 - Fotomicrografias de amostras de jejuno de camundongos Myd88 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	111
Figura 35 - Fotomicrografias de amostras de íleo de camundongos Myd88 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	112
Figura 36 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos Myd88 ^{-/-}	113
Figura 37 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmento de jejuno e íleo de camundongos MyD88 ^{-/-}	114
Figura 38 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue e fígado de camundongos MyD88 ^{-/-}	116
Figura 39 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso em camundongos TLR2 ^{-/-} em função do tempo.....	119
Figura 40 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos TLR2 ^{-/-}	120
Figura 41 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica em amostras de jejuno de camundongos TLR2 ^{-/-}	121
Figura 42 - Fotomicrografias de amostras de jejuno em camundongos TLR2 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	122
Figura 43 - Fotomicrografias de amostras de íleo em camundongos TLR2 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	123
Figura 44 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos TLR2 ^{-/-}	124
Figura 45 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmento de jejuno e íleo de camundongos TLR2 ^{-/-}	125
Figura 46 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue e fígado de camundongos TLR2 ^{-/-}	126
Figura 47 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso em camundongos TLR4 ^{-/-} em função do tempo.....	128
Figura 48 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos TLR4 ^{-/-}	129
Figura 49 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos TLR4 ^{-/-}	130

Figura 50 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais de camundongos TLR4 ^{-/-}	131
Figura 51 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso de camundongos TLR9 ^{-/-} em função do tempo.....	134
Figura 52 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia de camundongos TLR9 ^{-/-}	135
Figura 53 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos TLR9 ^{-/-}	136
Figura 54 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais de camundongos TLR9 ^{-/-}	137
Figura 55 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue e fígado de camundongos TLR9 ^{-/-}	138
Figura 56 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso de camundongos NOD1 ^{-/-} em função do tempo.....	141
Figura 57 - Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia de camundongos NOD1 ^{-/-}	142
Figura 58 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica de camundongos NOD1 ^{-/-}	143
Figura 59 - Fotomicrografias de amostras de jejuno de camundongos NOD1 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	144
Figura 60 - Fotomicrografias de amostras de íleo de camundongos NOD1 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	145
Figura 61 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos NOD1 ^{-/-}	146
Figura 62 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmento de jejuno e íleo de camundongos NOD ^{-/-}	147
Figura 63 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue e fígado de camundongos NOD1 ^{-/-}	148
Figura 64 - Efeito da injeção local do SN-38 sobre a relação peso/comprimento de alça intestinal isolada.....	150
Figura 65 - Efeito da injeção local do SN-38 sobre o volume secretório de alça intestinal isolada.....	151

Figura 66 - Fotomicrografias de cortes histológicos de alça intestinal isolada após a injeção local de SN38.....	152
Figura 67 - Efeito da injeção local do SN-38 sobre a análise morfométrica de alça intestinal isolada.....	153
Figura 68 - Efeito da injeção local do SN-38 sobre a atividade de MPO em alça intestinal isolada.....	154
Figura 69 - Efeito do SN-38 sobre a citotoxicidade <i>in vitro</i> em células IEC-6 determinado pelo método do MTT.....	156
Figura 70 - Efeito do SN38 sobre a viabilidade celular em células IEC-6 determinado pelo teste de exclusão de azul de tripan após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	157
Figura 71 - Fotomicrografias de células intestinais de rato (IEC-6) após 24 h de incubação com SN38.....	158
Figura 72 - Efeito do SN38 sobre a contagem do número de células IEC-6 após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	159
Figura 73 - Efeito do SN38 sobre a percentagem de células picnóticas após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	160
Figura 74 - Modelo Hipotetico proposto da patogênese da mucosite intestinal...	180

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Escores associados à mucosite oral e intestinal.....	36
Quadro 2 -	Risco de mucosite oral (MO) e Diarréia graus 3 e 4 por regime de QT e tipo de tumor	37
Quadro 3 -	Receptores Toll-like e seus principais ligantes.....	52
Quadro 4 -	Escores de avaliação da Diarreia em camundongos.....	66
Quadro 5 -	Escores de análise histopatológica para intestino delgado.....	68
Quadro 6 -	Escore de Análise histopatológica para cólon.....	69
Tabela 1 -	Mediana dos escores histopatológicos de segmentos intestinais após a indução da mucosite induzida pelo irinotecano.....	90
Tabela 2 -	Mensuração da temperatura retal (°C) em camundongos 5 e 7 dias após a injeção com irinotecano.....	94
Tabela 3 -	Percentagem de bacteremia em camundongos C57BL/6 injetados com Irinotecano 75mg/kg.....	101
Tabela 4 -	Identificação bioquímica de bacilos Gram negativos translocadas em órgãos estéreis após a injeção de irinotecano.....	103
Tabela 5 -	Percentagem de bacteremia em camundongos MyD88 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	115
Tabela 6 -	Percentagem de bacteremia em camundongos TLR4 ^{-/-} após a injeção de irinotecano.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
ANOVA	Análise de Variância
APC	7-etil-10-[4-N-(5-ácidoaminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina
BHI	Meio Brain Heart Infusion
CE	Carboxilestereases
COX-2	Ciclooxigenase-2
CCR	Câncer coloretal
C57BL/6	Camundongos <i>Imbred</i> da espécie C57BL/6
CPT-11	Irinotecano
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DEMEM	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
E.P.M	Erro padrão da média
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio
HPLC-PAD	Cromatografia líquida de alta pressão com detecção amperométrica pulsátil
H&E	Hematoxilina & Eosina
i.p	Intraperitoneal
IC50	Concentração Inibitória 50
IEC-6	Células intestinais da cripta de ratos normais
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IRAK	Kinase associada ao receptor da IL-1
IRI	Irinotecano
JNK	Proteína kinase c-Jun NH ₂ -terminal
L/M	Lactulose/Manitol

LPS	Lipopolissacarídeo
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88 (<i>Myeloid differentiation factor 88</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)2,5-difenil-2H tetrazolina bromido
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (<i>Nucleotide – binding oligomerization domain</i>)
NLR	Receptores do tipo NOD
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SN38	7-etil-10-hidroxicamptotencina (metabólito do Irinotecano)
SN38G	SN38 glicuronídeo
TGI	Trato Gastrointestinal
TIR	Domínio Toll/IL-1R
TLR2	Receptor <i>Toll like</i> tipo 2
TLR4	Receptor <i>Toll like</i> tipo 4
TLR9	Receptor <i>Toll like</i> tipo 9
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UGT1A1	Uridina 5´difosfato-glicuronosil-transferase
WT	Wild type (camundongos selvagens – C57BL/6)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
-/-	Nocaute
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
g	Gramas
kg	Quilogramas
M	Molar (concentração)
mg	Miligramas
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar (concentração)
μm	Micrômetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
1.1	MUCOSITE: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	34
1.1.1	Diarrea induzida pela Quimioterapia	37
1.1.2.	Alterações funcionais na mucosite intestinal	42
1.2	PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL POR ANTINEOPLÁSICOS	44
1.3	IRINOTECANO.....	29
1.4	RECEPTORES TOLL-LIKE	49
1.5	RECEPTORES NOD	55
2	OBJETIVOS	59
2.1	Geral:.....	59
2.2	Específicos:	59
3	MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1	ANIMAIS.....	61
3.2	ASPECTOS ÉTICOS	61
3.3	APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORAIS	62
3.4	DROGAS, SOLUÇÕES E CORANTES	63
3.5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	64
3.5.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	64
3.5.2	INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL	64
3.5.3	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DE INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO.....	65
3.5.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS DA BARREIRA INTESTINAL APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO	70
3.5.5	AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA, TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL LIKE 4 APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO.....	72
3.5.6	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA ADAPTADORA MYD88, RECEPTORES TOLL LIKE E NOD1 NA MUCOSITE INDUZIDA PELO IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS	74
3.5.7	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS <i>IN VIVO</i> DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38.....	74
3.5.8	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38 NAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	76
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	80
4	RESULTADOS	82

4.1	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DA INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO	82
4.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS DA BARREIRA INTESTINAL APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO	95
4.3	AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA, TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL LIKE 4 APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO 100	
4.4	AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA ADAPTADORA MYD88, RECEPTORES TOLL LIKE E NOD1 NA MUCOSITE INDUZIDA PELO IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS	106
4.4.1	Avaliação da participação da Proteína Adaptadora MyD88 na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano	106
4.4.2	Avaliação da participação do Receptor <i>Toll like</i> tipo 2 (TLR2) na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano	117
4.4.3	Avaliação da participação do Receptor <i>Toll like</i> tipo 4 (TLR4) na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano	127
4.4.4	Avaliação da participação do Receptor <i>Toll like</i> tipo 9 (TLR9) na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano	133
4.4.5	Avaliação da participação do receptor NOD1 na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano.....	139
4.5.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS <i>IN VIVO</i> DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38.....	149
4.6.	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS <i>IN VITRO</i> DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38.....	155
5	DISCUSSÃO	162
6	CONCLUSÃO	179
7	REFERÊNCIAS	181

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um conjunto de mais de cem doenças que tem em comum um crescimento desordenado de células malignas, sendo no momento, a segunda causa de óbito no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 27 milhões de casos novos de câncer no mundo em 2030, com uma expectativa de 17 milhões de mortes e 75 milhões de sobreviventes a esta doença. Assim, nas últimas décadas, esta doença tornou-se um problema de saúde pública mundial. Estima-se, ainda, que o câncer, já a partir de 2020, tornar-se-á a doença com a maior taxa de mortalidade, superando as doenças cardiovasculares (WHO, 2013). No Brasil, as estimativas para o ano de 2013, prevêem uma incidência aproximada de 518.510 casos de câncer, sendo 260.640 casos novos para o sexo feminino e 257.870 para o sexo masculino (INCA, 2013).

Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais prevalente em todo o mundo, com mais de 1,2 milhões de novos casos diagnosticados a cada ano, sendo responsável por cerca de 8% das mortes relacionadas ao câncer (FERLAY *et al.*, 2011).

O impacto destas estatísticas é parcialmente amenizado quando ressaltamos os importantes avanços terapêuticos na última década que prolongaram substancialmente a sobrevida dos pacientes portadores desta grave neoplasia. Como por exemplo, a quimioterapia paliativa aumenta a sobrevida global, a sobrevida livre de progressão e a qualidade de vida nos pacientes com CCR metastático (CCRm) (PESSINO, SOBRERO, 2006).

Por mais de 40 anos, a quimioterapia baseada em 5-fluorouracil (5-FU) era o único tratamento com atividade no CCRm. No entanto, durante os últimos 10 anos, uma série de drogas tem demonstrado atividade para o CCR metastático. Oxaliplatina combinada com 5-FU/leucovorin bimensal mostrou ser superior a 5-FU/leucovorin em termos de taxa de resposta, sem ter um impacto negativo sobre a qualidade de vida dos pacientes (De GRAMONT *et al.*, 2000). Os benefícios da incorporação do irinotecano ao tratamento sistêmico dos pacientes com CCR metastático foram recebidos com entusiasmo pelos oncologistas na década de 90. O estudo de SALTZ *et al.* (2000) mostrou taxas de resposta e

sobrevida inéditas até então, para estes pacientes com CCR metastático. O estudo mostrou que a combinação de 5-FU com o irinotecano apresentou taxas de resposta de aproximadamente 55% com uma sobrevida mediana de 22 meses. No entanto, no mesmo estudo, a mortalidade associada ao regime com fluorouracil em *bolus*, exigia cautela e motivou a investigação por um comitê independente para identificar os motivos que teriam causado este problema. A investigação se debruçou sobre os resultados dos estudos de Saltz *et al.* (2000) e de Goldberg e Gill (2004) e suas conclusões foram publicadas em outro artigo (ROTHENBERG *et al.* 2001). Estas conclusões apontaram para a alta frequência de uma síndrome de toxicidade gastrointestinal, sobretudo com diarreia severa.

A incontestável melhora das taxas de resposta e sobrevida global obtidas com esquemas de drogas quimioterápicas baseados em irinotecano tornou-se um grande estímulo ao uso cada vez mais frequente desse agente, inclusive antecedendo o tratamento cirúrgico. No entanto, o sinergismo destas vertentes terapêuticas tem sido limitado por importantes toxicidades, como a diarreia associada à mucosite intestinal e em menor escala a esteatohepatite (SALTZ *et al.*, 2000; MABRO *et al.*, 2003), que em certas situações podem determinar desde a redução do esquema terapêutico até a sua total interrupção, assim, podendo trazer grande prejuízo na eficácia do tratamento oncológico.

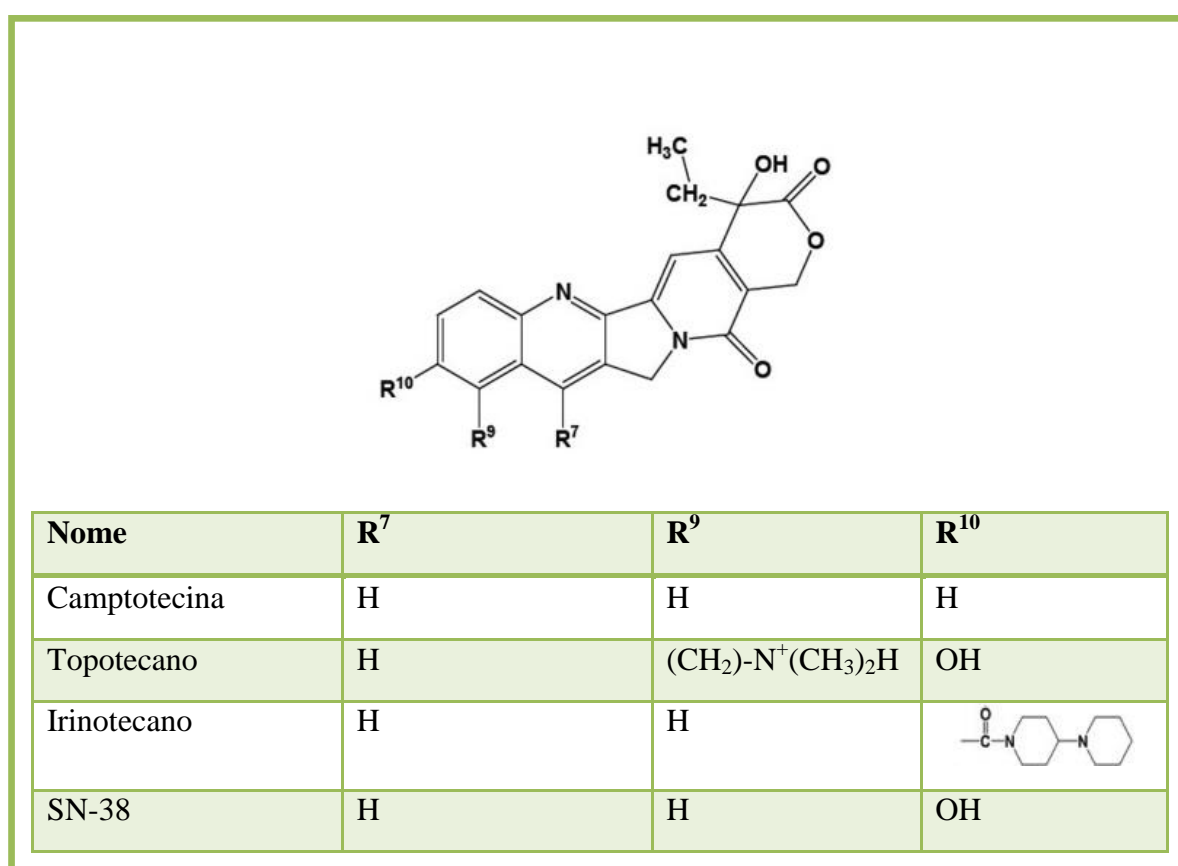
1.1 IRINOTECANO

O Irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina. Esta substância foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por WALL *et al.*, em 1966, de uma planta nativa na China e no Tibet, *Camptotheca acuminata*, onde é conhecida como *xi shu* (árvore feliz). Este composto consiste de um alcaloide tipo quinolona que, por sua vez, tem sido modificado para dar origem a muitos compostos com atividade antineoplásica, incluindo o topotecano e o irinotecano (**Figura 1**).

A camptotecina não se mostrou adequada para o desenvolvimento farmacêutico, principalmente por sua reduzida solubilidade. Estudos envolvendo a triagem clínica do sal sódico não foram bem sucedidos, pois se evidenciou que a abertura do anel lactônico para a preparação do sódio inativa a substância. Esta descoberta abriu caminho para a primeira geração de fármacos análogos da camptotecina, como o topotecano e o irinotecano (CPT-11), ambos solúveis em água, na forma de sais, preservando-se a subunidade farmacofórica

iridoídica, representada pelo anel lactônico hidroxilado. O topotecano e o irinotecano foram inicialmente aprovados pela Food and Drug Association (FDA) para o tratamento de câncer de ovário recorrente e câncer de cólon, respectivamente (Revisto por CHEN *et al.*, 2012). Nos últimos anos, o irinotecano tem sido utilizado como agente único ou combinado com outros quimioterápicos em protocolos para tratamento de primeira e segunda linha do câncer colorretal (SALTZ *et al.*, 2001), e também utilizado no câncer de ovário (FUJII *et al.*, 2000), linfoma de Hodgkin (RIBRAG *et al.*, 2003), câncer de pulmão de células pequenas e não pequenas (LANGER, 2004), pâncreas (ROCHA-LIMA *et al.*, 2004), mama (PEREZ *et al.*, 2004) e de estômago (ENZINGER *et al.*, 2005).

FIGURA 1 – Estruturas químicas da Camptotecina, Topotecano, Irinotecano e SN38.

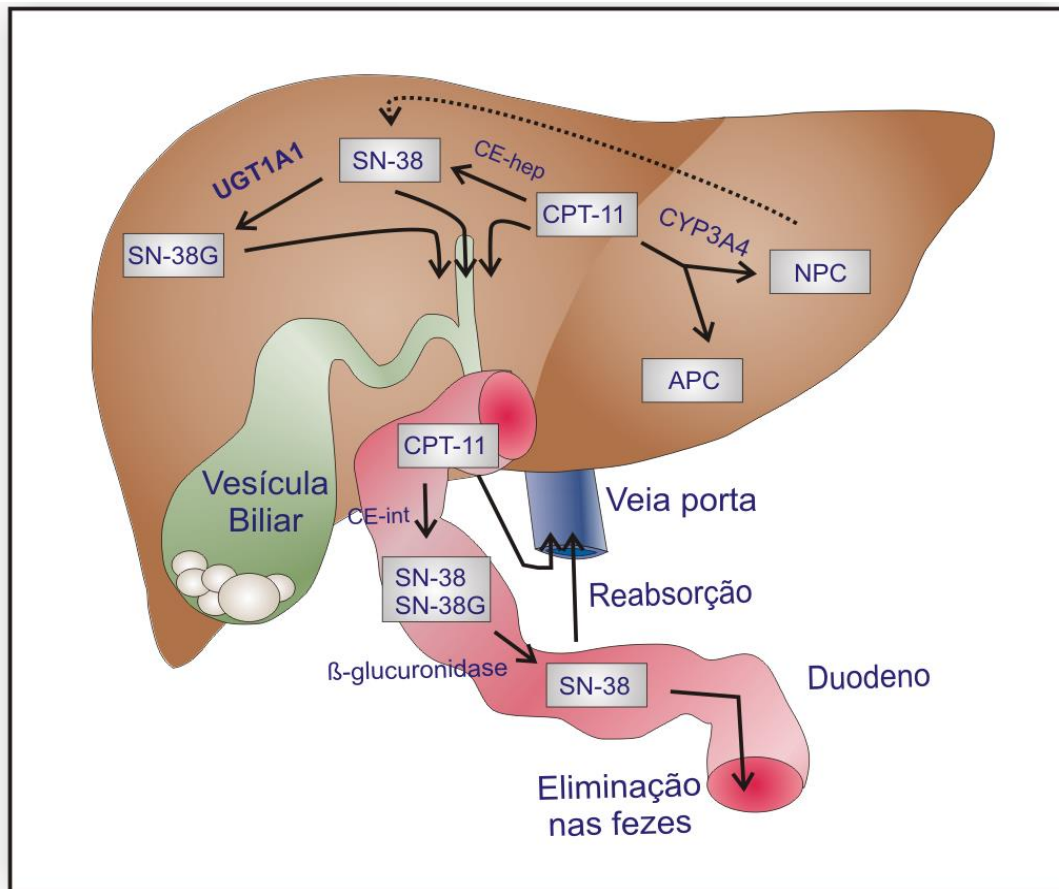


Fonte: Modificado de CHEN *et al.*, 2012.

O irinotecano é uma pró-droga que é convertida em seu metabólito ativo, SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), pela enzima carboxilesterase (CE) hepática (**Figura 2**)

(KAWATO *et al.* 1991). A CE se encontra presente abundantemente no fígado e em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. O SN-38 é formado a partir do irinotecano, por clivagem da ligação de carbamato entre a fração camptotecina e a cadeia lateral dipiperidina (**Figura 3**) mediada por uma carboxilesterase (GUICHARD *et al.*, 1999; ALIMONTI *et al.*, 2003). Posteriormente, o SN-38 sofre glucoronização pela enzima uridina difosfato glucoronil-transferase – 1A1 (UDP-GT 1A1) ao SN38 glucoronídeo (SN38G). O SN38 e o SN38G são excretados por via biliar respondendo por 63,7% da eliminação da droga (SLATTER *et al.* 2000). A expressão da enzima UDP-GT1A1 parece estar inversamente relacionada à prevalência dos efeitos tóxicos (CÔTÉ *et al.* 2007; SCHULZ *et al.* 2009; FERRALDESCHI *et al.* 2009; SHULMAN *et al.* 2011).

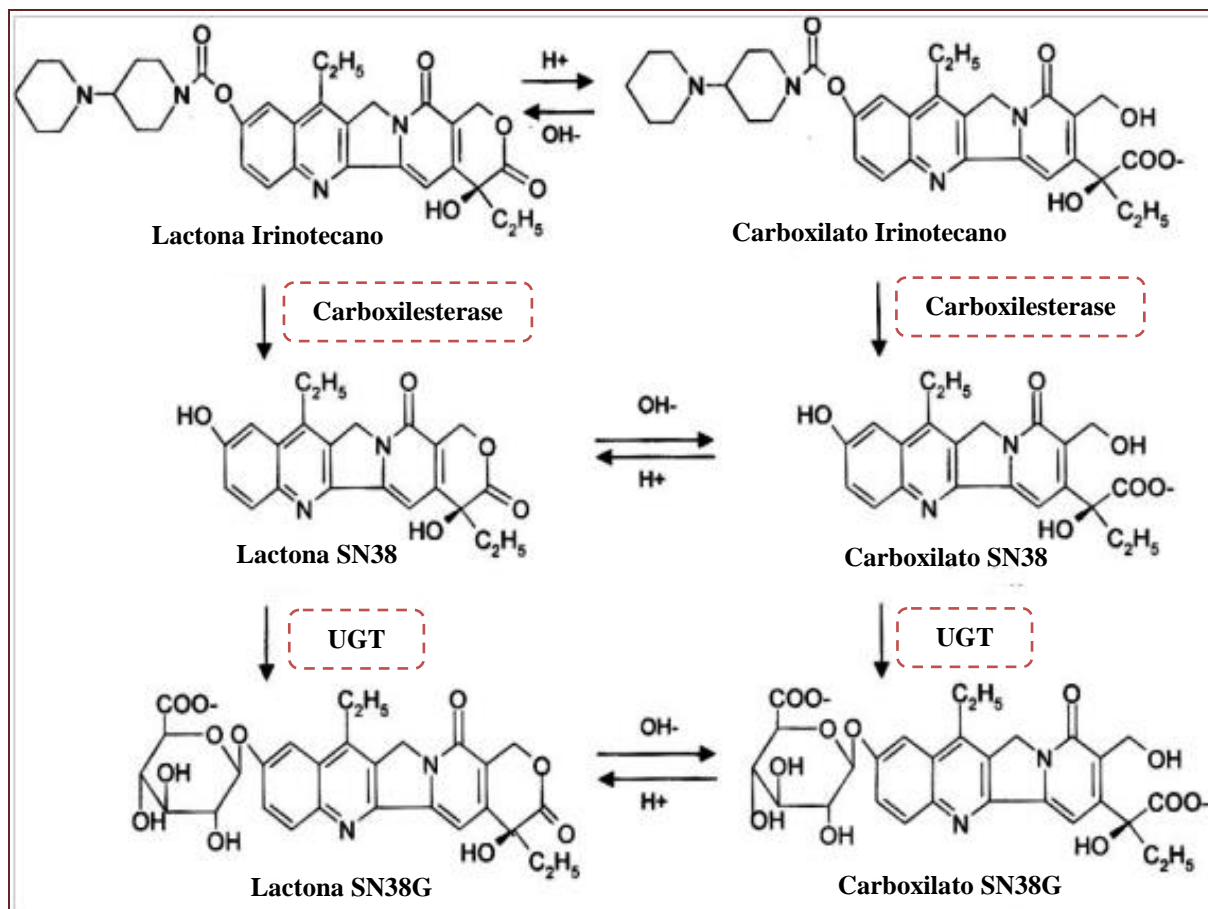
FIGURA 2 – Metabolismo do Irinotecano



O fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o CPT-11 gerando dois compostos inativos, APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela carboxilesterase (CE) em SN-38. A depuração do SN-38 é feita no fígado pelo polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1), gerando glicuronídeos de SN-38 (SN-38G), que são desprovidos de atividade biológica. CPT-11, SN-38 e SN-38G são excretados na bile e chegam ao intestino delgado. No intestino delgado, o CPT-11 pode ser clivado pela CE intestinal, formando mais SN-38. Além disso, o SN-38G pode ser desconjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de β -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido iniciando um processo de recirculação entero-hepática (TAKASUNA *et al.*, 1996; CHESTER *et al.*, 2003; TALLMAN, 2005).

Os estudos bioquímicos e análises de citotoxicidade realizados *in vitro* em células tumorais humanas e de roedores indicam, de forma consistente, que o SN-38 é, pelo menos, 1000 vezes mais potente como um inibidor de topoisomerase I do que o irinotecano (RIVORY *et al.*, 1996; CHESTER *et al.*, 2003; TAKIMOTO, ARBUCK, apud KOIZUMI *et al.*, 2006).

FIGURA 3 – Detalhes estruturais de produtos do metabolito do irinotecano



Glicuronização do composto SN-38 precedida da clivagem do irinotecano pela carboxil esterase. A Figura descreve as formas lactona e carboxilato de cada composto. (TALLMAN *et al.*, 2005).

O irinotecano e seu metabólito ativo (SN-38) são inibidores seletivos da topoisomerase I, uma enzima nuclear essencial que atua sobre a dupla fita de DNA, relaxando a supertorção gerada durante a fase de transcrição e replicação do DNA (WANG, 1996). Devido ao tamanho do cromossomo eucariótico, a remoção da supertorção se faz necessária e é realizada através da introdução de quebras transitórias em uma das cadeias da dupla fita de DNA, o que permite que a cadeia quebrada gire em torno da fita complementar intacta e a supertorção, conseqüentemente, seja removida. Após o relaxamento, a ligação intermediária covalente entre a topoisomerase I e o DNA se desfaz, sendo a taxa de religação da fita clivada normalmente mais rápida que a taxa de clivagem (CHAMPOUX, 2001).

Acredita-se que a acumulação intestinal dos metabólitos do irinotecano, em especial o SN-38, seja responsável pela mucosite decorrente do tratamento quimioterápico à base deste agente (GUPTA *et al.*, 1994). Gupta e colaboradores (1994) estabeleceram uma relação linear entre o índice de concentração biliar de metabólitos do irinotecano e a toxicidade gastrointestinal. Contudo, até o momento, nenhum estudo efetivamente identificou o papel individual dos metabólitos sobre a mucosite intestinal decorrente do tratamento com irinotecano. Os principais efeitos colaterais relacionados ao tratamento com irinotecano são neutropenia, mucosite e diarreia, que frequentemente ocorrem simultaneamente.

1.2 MUCOSITE: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Mucosite alimentar ou gastrointestinal é o termo clínico usado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral ou mucosa intestinal). A alta prevalência de manifestações clínicas adversas como disfagia, dispepsia, diarreia, náuseas e vômitos, dor abdominal, úlceras orais e anorretais, entre outras, são resultado da pouca seletividade dos agentes antineoplásicos e da alta taxa de proliferação do epitélio do trato gastrointestinal (GIBSON & KEEFE, 2006). Qualquer região da mucosa digestiva (desde a boca ao ânus) pode ser afetada, e por esta razão, o termo mucosite gastrointestinal, mais abrangente, tem sido considerado o mais adequado para descrever o processo (SONIS *et al.*, 2004; SCULLY & SONIS, 2006).

A mucosite induzida por drogas antineoplásicas é um importante, dose-limitante e dispendioso efeito colateral da terapia do câncer (SONIS *et al.* 2004, RUBENSTEIN *et al.* 2004). De forma geral, cerca de 15 a 40% dos pacientes em quimioterapia antineoplásica apresentam algum grau de mucosite (ELTING *et al.*, 2003 e 2007; RUBENSTEIN *et al.* 2004), podendo modificar a intensidade, duração e eficácia do tratamento em cerca de 50% dos casos (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006). Quando se associa irradiação à quimioterapia em altas doses, no transplante de células tronco hematopoiéticas, a prevalência de mucosite atinge quase 100% dos pacientes, afetando mais de dois milhões de pessoas no mundo a cada ano (GIBSON *et al.*, 2013).

A diarreia, o sintoma mais marcante na mucosite intestinal, é observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando se observa diarreia de grau 3-4 (**Quadro 1**) em até 25% dos pacientes (KEEFE *et al.* 2007).

Cerca de 5-15% dos pacientes com mucosite podem ser acometidos com a forma mais grave desta doença (graus 3 e 4 - **Quadro 1**). Destes, 35% sofrerão um atraso nos ciclos subsequentes de quimioterapia, 60% irão requerer redução nas doses aplicadas e 30%, a descontinuação do regime de tratamento. Em geral, 60% apresentam febre e requerem hospitalização (KEEFE *et al.*, 2007). Além disso, em pacientes neutropênicos, muito em consequência da quimioterapia, a presença de mucosite representa um aumento de quatro vezes no risco de sepse (RUBENSTEIN *et al.* 2004). O reflexo desses dados envolve o aumento da morbidade e mortalidade de pacientes com câncer. Portanto, esse efeito adverso tem o potencial de interferir diretamente na eficácia do tratamento, aumentando os custos com a terapia e apresentando um grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes.

QUADRO 1- Escores associados à mucosite oral e intestinal

Escore para Lesão	Efeito Colateral			
	Mucosite Oral	Mucosite oral por radiação		Mucosite intestinal à quimioterapia (Diarreia)
	OMS	NCI -CTC	RTOG	NCI -CTC
Grau 0 (nenhum)	Sem achados objetivos	Sem achados objetivos	Sem achados objetivos	Sem diarreia
Grau 1 (Leve)	Descamação associada ou não com eritema e dor	Eritema da mucosa	Irritação, possível quadro de dor leve que não requer analgesia	< 4 episódios/dia
Grau 2 (Moderado)	Ulceração com ou sem eritema. Capacidade de ingestão de sólidos	Com manchas, reação pseudomembranosa (manchas de maiores dimensões >1,5cm, não contíguas)	Mucosite com manchas que podem produzir um exudato inflamatório, dor moderada que requer analgesia	4-6 episódios/dia Hidratação < 24h
Grau 3 (Grave)	Ulceração com ou sem eritema extenso. Capacidade de ingestão de líquidos somente	Reação pseudomembranosa (manchas contíguas às de maiores dimensões >1,5 cm não contíguas)	Mucosite confluyente fibrinosa; dor grave que requer narcóticos	≥ 7 episódios/dia Hidratação ≥ 24h
Grau 4 (Risco à vida)	Ulceração, alimentação não é possível. Líquidos apenas na forma de suspensão para medicação. NPT requerida	Úlceras ou sangramentos ocasionais, não causados por traumas menores ou abrasões	Úlceras hemorrágicas ou necróticas	Risco à vida
Grau 5 (Morte)	-	Morte devido à toxicidade	-	Morte

Fonte: Graus para mucosite definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) e National Cancer Institute - Common Toxicity Criteria for Adverse Events v3.0 (NCI-CTC). NPT: Nutrição Parenteral.

A incidência e a gravidade da mucosite, assim como a sua localização, variam em função do tipo de quimioterapia, se mono ou poliquimioterapia, do regime empregado e, conseqüentemente, da localização do tumor. De acordo com uma revisão de Keefe *et al* (2007) e evidenciado no **quadro 2**, observa-se uma maior incidência de mucosite intestinal em relação à oral, nos pacientes em tratamento para câncer de cólon, uma baixa incidência de

mucosite oral e intestinal em pacientes submetidos ao tratamento de câncer de pulmão, e uma alta incidência de mucosite oral em relação à intestinal, nos regimes para tratamento de câncer de mama e linfoma.

QUADRO 2 – Risco de mucosite oral (MO) e Diarréia graus 3 e 4 por regime de QT e tipo de tumor

Tipo de Câncer	Regime de QT	Numero		Risco MO (Graus 3-4)		Risco diarréia (Graus 3-4)	
		Estudos	Pacientes	%	95% IC	%	95% IC
Linfoma	CHOP-DI-14	4	231	7,8	5,28-11,32	2,36	1,32-4,65
	CHO EP-14	2	346	10,4	7,23-13,44	0,29	0,29-1,01
Mama	AC (semanal)	1	22	13,6	2,27-27,27	2,27	2,27-9,09
	AC-T	1	36	8,33	1,39-19,44	1,39	1,39-5,56
Pulmão	Gemcitabina+ Paclitaxel	2	109	1,84	1,02-5,33	3,69	2,05-6,97
	Platina+ Paclitaxel+ outro	7	451	1,47	1,20-3,07	2,80	2,17-4,54
Colorectal	FOLFIRI	2	79	4,43	1,90-9,49	10,13	4,43-16,46
	IROX	3	337	1,48	0,59-2,97	24,33	19,59-29,08

Fonte: Adaptado de Keefe *et al.*, 2007

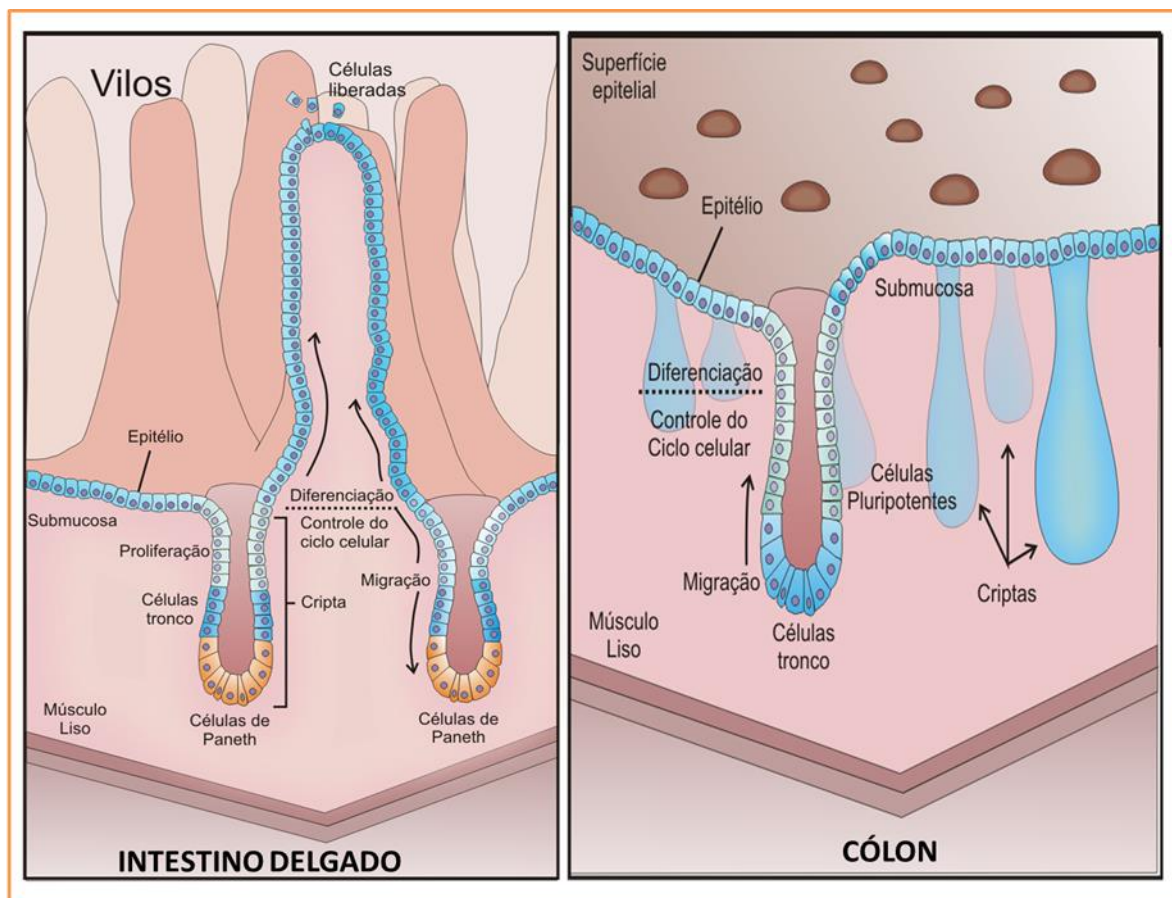
95% IC: Intervalo de confiança de 95%. QT: Quimioterapia. MO: mucosite oral. CHOP: Ciclofosfamida/Doxorrubicina/Vincristina/Prednisona. AC: Doxorrubicina/Ciclofosfamida. AC-T: AC seguido de Paclitaxel. FOLFIRI: 5-FU/Irinotecano/Leucovorin. IROX: Irinotecano/Oxaliplatina injetável.

1.1.1 Diarreia induzida pela Quimioterapia

O intestino exerce funções importantes para a saúde do organismo, como: digestão e absorção de macro e micronutrientes, produção de importantes hormônios reguladores, pode funcionar como órgão imune e agir como barreira contra agentes nocivos (DUNCAN; GRANT, 2003). O intestino é formado por três camadas básicas, a camada epitelial, a lâmina

própria e a muscular da mucosa. A monocamada epitelial intestinal é composta de tipos celulares variados, como, por exemplo, epitélio colunar (enterócitos e colonócitos), células caliciformes, células entero-endócrinas e de Paneth. A camada mucosa de mamíferos em geral apresenta uma alta capacidade de renovação, ocorrendo uma troca completa dos tipos celulares de revestimento a cada 24 a 96 horas (**Figura 4**) (LIPKIN *et al*, 1963 apud GOKE, PODOLSKY, 1996).

FIGURA 4 – Estrutura do intestino.



Fonte: Adaptado de SANCHO, BATTLE, CLEVERS, 2004. *Nat Rev Cell Dev Biol*, 20:695-723, 2004. Painel **Painel A**: Estrutura do intestino delgado. **Painel B**: Estrutura do intestino grosso.

O uso de quimioterápicos pode levar a defeitos na divisão celular e na renovação epitelial, isso ocasiona perda rápida da estrutura e função do intestino (DUNCAN & GRANT, 2003). A destruição celular gastrointestinal observada na mucosite por uso de quimioterápicos é resultado de hipoproliferação celular, com atrofia das vilosidades, aprofundamento das criptas que resulta de disfunção absorviva, alteração na secreção de eletrólitos, principalmente

Na⁺ e K⁺, que pode resultar em diarreia (KEEFE *et al.*, 1997; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2003).

A diarreia é um dos eventos mais comumente observados no curso da mucosite intestinal associada à quimioterapia do Câncer (ARNOLD *et al.*, 2005). Aproximadamente 10% dos pacientes com câncer avançado apresentam diarreia aguda ou persistente induzida pela quimioterapia, com grau de severidade de moderada a fatal. Alguns agentes quimioterápicos, incluindo fluouropirimidinas (BUROKER *et al.*, 1994) e Irinotecano (SALTZ *et al.*, 2000), são associados com um elevado risco de diarreia induzida pela quimioterapia. Assim, 80% dos pacientes tratados com esses agentes, sozinhos ou em combinação, apresentam diarreia, e 30% dos pacientes apresentam quadros graves de diarreia e desequilíbrio hidroeletrólítico com sério risco de vida (BENSON *et al.*, 2004; CROWN *et al.*, 2008). A diarreia pode atrasar o tratamento ou reduzir a doses da medicação, isso reduz a eficácia do tratamento quimioterápico. O manejo dos eventos de diarreia também aumenta o custo do tratamento do Câncer.

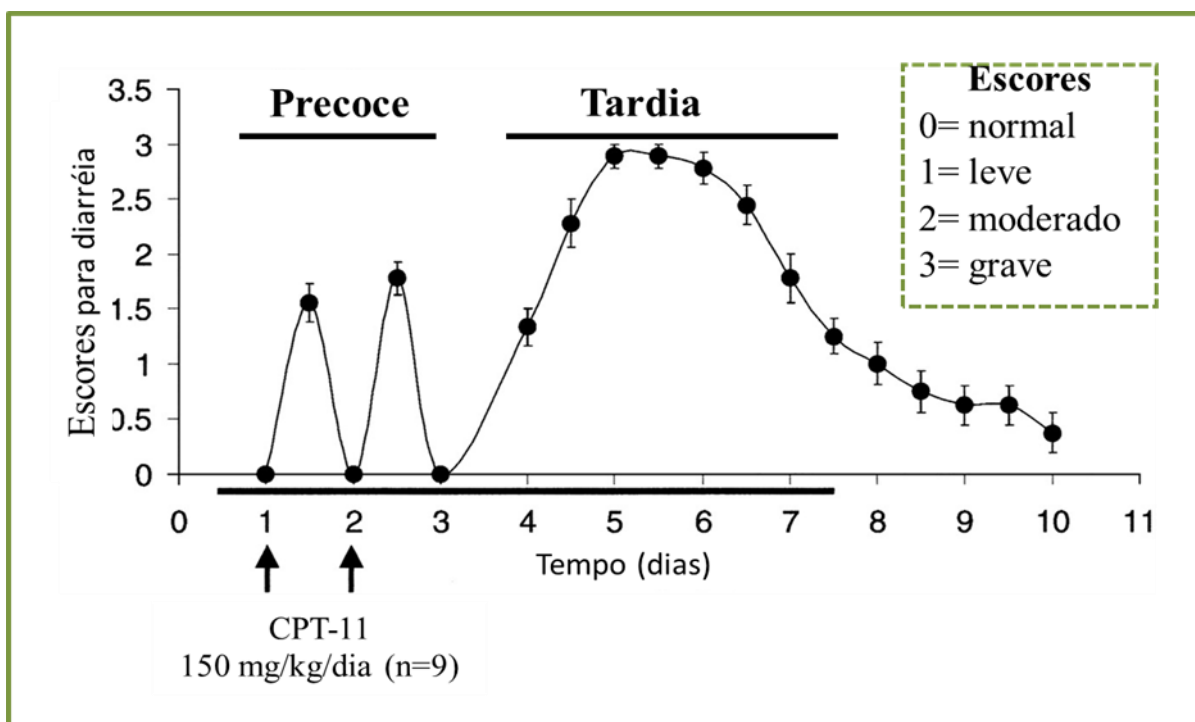
Alguns agentes quimioterápicos exercem efeitos citotóxicos nas células das criptas que se dividem rapidamente no epitélio intestinal, que pode levar a uma perda relativa da capacidade absorptiva intestinal em comparação com a capacidade secretória. Além disso, a destruição citotóxica ou o aumento de enzimas envolvidas na digestão de proteínas e carboidratos podem alterar o gradiente osmótico no intestino e contribuir para a diminuição da reabsorção e aumentar a secreção de líquidos e eletrólitos nas fezes, resultando em diarreia (WADLER & SCHWARTZ, 1995).

A diarreia pode ser classificada em 4 tipos de acordo com os mecanismos subjacentes: Diarreia osmótica, secretória, exsudativa ou por distúrbio de motilidade. No entanto, muitas vezes a diarreia é uma combinação desses mecanismos (Revisto por RICHARDSON & DOBISH, 2007). A diarreia osmótica pode ser causada pela excessiva ingestão ou absorção diminuída de solutos hidrossolúveis, os quais retêm água e eletrólitos no lúmen intestinal (FIELD, 2003). Este tipo de diarreia pode ocorrer após a ingestão de solutos pouco absorvíveis, tais como, lactulose, sorbitol ou magnésio, ou como resultado de um déficit absorptivo, como em pacientes com intolerância a lactose ou aqueles com doença celíaca. A diarreia secretória resulta de uma sobre estimulação da capacidade secretória intestinal. Certos estímulos tais como, enterotóxicas bacterianas, ácido biliar, mediadores inflamatórios, e

hormônios gerados pelos tumores neuroendócrinos, podem causar a diarreia secretória (FIELD, 2003). A diarreia exsudativa é causada pelo rompimento do epitélio intestinal, levando à perda de água e eletrólitos, muco, proteínas, e algumas vezes perdas 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. Em relação à diarreia induzida pela quimioterapia, incluindo o irinotecano, parece ter um componente primariamente secretório, e um componente exsudativo (VIELE, 2003).

A diarreia induzida pelo Irinotecano é constituída de duas fases: uma fase inicial, que ocorre até 24h após o tratamento com o antineoplásico Irinotecano, estando relacionado com uma estimulação colinérgica, o que permite o manejo profilático com atropina, e uma fase tardia, que aparece entre o segundo e o vigésimo primeiro dia após o início do tratamento, mas principalmente entre o sexto e o décimo dia após a administração da droga (**Figura 5**) (TRIFAN *et al*, 2002).

Diversos trabalhos investigaram a fase tardia da diarreia induzida por irinotecano e têm sugerido mecanismos diversos como citotoxicidade direta (IKUNO *et al.*, 1995) ou interferência direta com a microbiota intestinal através do aumento da atividade da enzima β -glicuronidase (TAKASUNA *et al.*, 1996). Mais recentemente, tem se demonstrado o papel das citocinas TNF- α , IL-1 β , KC (MELO *et al.*, 2008) e IL-18, além de uma importante participação do óxido nítrico (LIMA-JÚNIOR, 2008) no desenvolvimento da mucosite intestinal e diarreia induzida por irinotecano. Contudo, o mecanismo preciso através do qual o irinotecano induz mucosite intestinal e, conseqüentemente, diarreia é ainda desconhecido.

FIGURA 5 – Fases da diarreia associada ao Irinotecano

Irinotecano induz diarreia precoce e tardia. Ratos Sprague Dawley receberam duas administrações diárias de irinotecano na dose de 150 mg/kg, via endovenosa. A diarreia foi avaliada duas vezes ao dia, através de escores: 0=normal; 1 = leve, 2 = moderado e 3 = grave. Fonte: TRIFAN *et al* 2002. Cancer Res, 62: 5778-5784, 2002. CPT-11: irinotecano.

A importância clínica se torna evidente se considerarmos que a diarreia pode, muitas vezes, requerer alterações no esquema de tratamento antineoplásico adotado ou, até mesmo, comprometer a viabilização do tratamento. A diarreia é geralmente controlada com loperamida, porém nos casos mais graves do evento adverso (graus 3 e 4) o tratamento se mostra ineficaz. Outras estratégias têm sido sugeridas para o manejo clínico da diarreia, tais como octreotida, acetorfan, antibióticos, glutamina, budesonida, IL-15, talidomida, inibidores da enzima cicloxigenase-2, ciclosporina e alcalinização do lúmen intestinal (GIBSON & KEEFE, 2006).

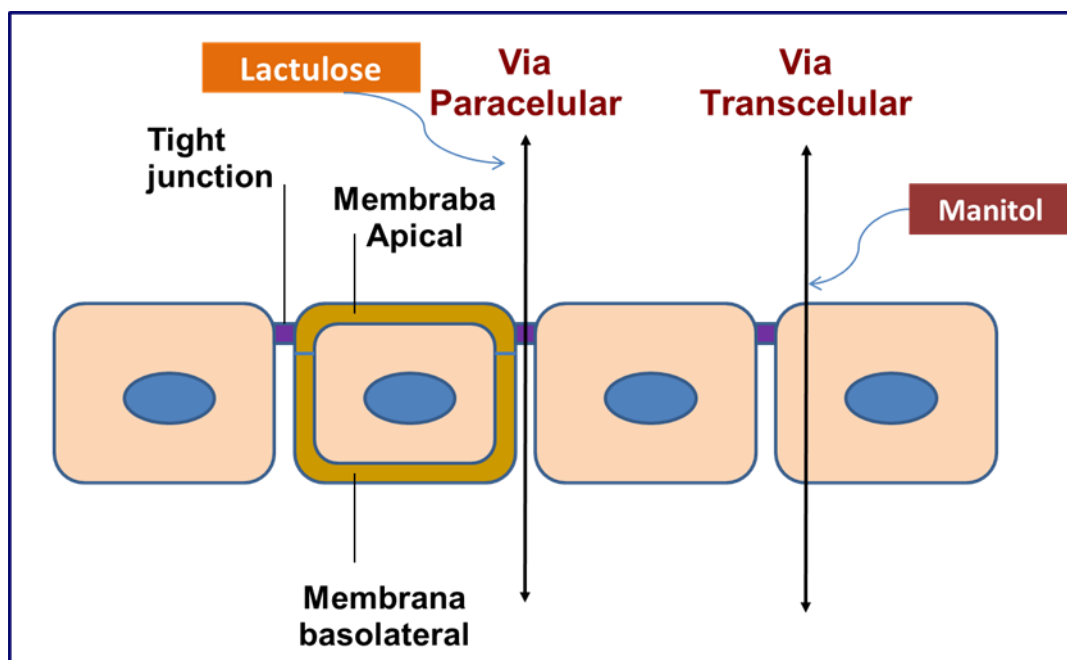
1.1.2. Alterações funcionais na mucosite intestinal

A barreira funcional intestinal representa uma barreira seletiva ao transporte transepitelial de íons, solutos e água. As propriedades da barreira intestinal variam ao longo do epitélio sob influência de fatores fisiológicos e mais severamente por estímulos fisiopatológicos. (DIAMOND, 1978; MENZIES, 1974).

O teste de permeabilidade intestinal com açúcares inertes surge como ferramenta experimental de grande relevância para quantificar alterações de permeabilidade em processos patológicos intestinais, essas alterações de permeabilidade podem ser quantificadas de maneira simples e não invasiva. A medição por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) da excreção urinária de monossacarídeos como a D-xilose ou o Manitol e de dissacarídeos como a celobiose ou a lactulose.

A lactulose e o manitol se firmaram como sondas ideais, pois não sofrem interferência com mecanismos de transporte ativo e não sofrem metabolização no organismo. Em sua estrutura morfológica, o epitélio intestinal apresenta diferentes propriedades para absorver estas moléculas. À medida que as células se reproduzem nas criptas intestinais e vão amadurecendo em seu percurso rumo ao ápice dos vilos, as junções intercelulares vão se tornando menos permeáveis e a dimensão dos poros protéicos celulares diminui. O manitol é absorvido passivamente por via transcelular e por poros de pequenas dimensões (6 Å) presentes no ápice dos vilos, refletindo a área absorptiva, a lactulose exige a presença de grandes poros (50-60 Å), que são restritas as criptas localizadas na base dos vilos. A lactulose permeia as junções intercelulares e espaços intervilosos mensurando áreas de lesão e ruptura de barreira (via paracelular) (**Figura 6**) (Revisto por MELICHAR & ZEZULOVA 2011).

FIGURA 6 – Transporte através do epitélio intestinal



O transporte de moléculas através do trato gastrointestinal pode ocorrer por via paracelular e transcelular. O manitol (monossacarídeo) atravessa o epitélio pela via transcelular e a lactulose (dissacarídeo) por via paracelular através das proteínas de junção (Tight junction). Fonte: Adaptado de TURNER (2009). *Nat Rev Immunol*, 9: 799-809.

O teste de permeabilidade intestinal tem sido amplamente utilizada em estudos clínicos com crianças portadores de síndromes diarréicas (LIMA *et al.* 2002), e pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida por vírus da imunodeficiência humana (HIV-SIDA) (TEPPER *et al.* 1994; LIMA *et al.* 1997), doença celíaca ou doença inflamatória intestinal (VOGELSANG *et al.* 1998; JOHNSTON, SMYER, WATSON, 2001) e alergia à proteína do leite materno (DE BOISSIEU *et al.* 1994). Adicionalmente, alterações da permeabilidade foram observadas em pacientes com câncer, mesmo em ausência da quimioterapia, terapias alvos ou radioterapia (MELICHAR & ZEZULOVA 2011).

Carneiro-filho e colaboradores (2004) demonstraram que ratos tratados com o agente antineoplásico metotrexato apresentavam perda de peso associado a uma diminuição da absorção e da atividade enzimática do epitélio, além da destruição da mucosa do duodeno, jejuno e íleo, com presença de infiltrado celular, reforçando a hipótese da fase inflamatória da

mucosite. Ademais, foi demonstrada uma redução da excreção de manitol e um aumento da secreção intestinal de sódio e potássio, quando os ratos foram injetados com metotrexato, mostrando que a permeabilidade do intestino estava alterada. Essas alterações da permeabilidade intestinal a vários açúcares e aumento da secreção intestinal de íons sugerem que os efeitos deletérios sistêmicos, como desnutrição e desidratação, advêm principalmente dos danos causados à capacidade absorptiva da mucosa intestinal (KEEFE *et al*, 1997).

Outro aspecto funcional avaliado na mucosite intestinal foi a motilidade gastrintestinal. Nesse sentido, Soares e colaboradores (2008) demonstraram que os efeitos da mucosite intestinal induzida por 5-FU, esta associada a desordens da motilidade gastrintestinal (retardo no esvaziamento gástrico e hipercontratilidade do músculo liso gastrintestinal) tanto na fase inflamatória como na fase pós-inflamatória da mucosite. Adicionalmente, Belarmino-filho (2010) evidenciou que a administração de irinotecano em camundongos promoveu alteração da motilidade digestória. Ademais, o autor demonstrou que a dexametasona reverte a dismotilidade associada à mucosite por irinotecano (BELARMINO-FILHO, 2010). Essas observações sugerem claramente que a inflamação do trato gastrintestinal pode causar significativas alterações funcionais, e que os possíveis mecanismos ainda precisam ser elucidados.

1.3 PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL POR ANTINEOPLÁSICOS

Muito tem se descoberto, em parte com a contribuição do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA, que nos últimos anos vem desenvolvendo modelos experimentais de mucosite intestinal com antineoplásicos (**Figura 7**). Um dos diferenciais do modelo de Mucosite intestinal (MI) induzida por irinotecano é a existência de uma intensa diarreia, quando comparado a outros fármacos, além dos eventos inflamatórios intestinais.

Nesse contexto, foi observado que o tratamento com irinotecano em camundongos causou uma significativa diarreia nos animais, com diminuição dos vilos intestinais e perda da arquitetura das criptas. Em nossos estudos verificamos que citocinas, como o TNF- α , IL-1 β e KC, a quimiocina análoga da IL-8 humana no camundongo, tiveram seus níveis elevados

devido ao irinotecano, e a modulação farmacológica com talidomida ou pentoxifilina, preveniu significativamente o desenvolvimento das lesões intestinais (MELO *et al.*, 2008). Outro estudo experimental (LOGAN *et al.* 2008b) caracterizou as alterações morfológicas induzidas pelo irinotecano em mucosa oral (atrofia epitelial), jejuno (achatamento dos vilos e criptas) e cólon (encurtamento de criptas) de ratos, com expressão imunohistoquímica aumentada de NFκB, IL-1β, TNF-α e IL-6 na mucosa do trato gastrointestinal sobretudo nas horas seguintes à administração do irinotecano.

Adicionalmente, foi estudado o papel de diversas citocinas e do óxido nítrico (NO) na patogênese da mucosite intestinal induzida diferencialmente por diversos quimioterápicos, tais como Metotrexato (LEITÃO *et al.*, 2011), Irinotecano (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012) e 5-fluoruracil (SOARES, 2008). Dessa forma, demonstrou-se que na mucosite intestinal por irinotecano citocinas, como a interleucina 18 (IL-18) e o TNF-α, parecem aumentar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida com consequente formação de NO, o qual parece gerar intermediários reativos tipo o radical peroxinitrito, que possivelmente é o mediador final da lesão da mucosa observada em camundongos injetados com irinotecano.

Tal demonstração foi possível mediante bloqueio farmacológico da ação da IL-18, por meio da administração sistêmica da proteína ligante da IL-18 (IL-18bp) e por meio da deleção gênica em camundongos para a IL-18 (LIMA-JÚNIOR, 2008). Nesses animais, verificou-se que a atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é reduzida, portanto, com menor síntese de NO. A repercussão da modulação da ação da IL-18 envolveu a redução de danos funcionais (diarreia e hipercontratilidade intestinal), inflamatórios (detectado pelo aumento de infiltrado neutrofílico) e estruturais no intestino (redução da altura de vilos, hiperplasia de criptas, apoptose e vacuolização celular) (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Adicionalmente, o uso do infliximabe, um anticorpo monoclonal para TNF-α, reduziu de maneira importante a expressão de iNOS, detectada por western blot (FIGUEIREDO, 2011). De maneira complementar, a participação do NO, neste modelo de toxicidade, foi investigada em animais knockout para iNOS ou tratados com aminoguanidina, um inibidor de iNOS, os quais apresentaram reduzidos danos intestinais de modo similar aos achados experimentais descritos para a modulação da ação da IL-18 (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Outras citocinas da família da IL-1 parecem estar relacionadas à mediação da mucosite intestinal. O envolvimento da Caspase-1, enzima que converte a pró-IL-1, a pró-interleucina 18 (IL-18) e a pró-interleucina 33 (IL-33) em suas formas ativas, na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano, foi demonstrada em camundongos, visto que há atenuação dessa toxicidade em animais *knockout* para caspase-1 (LIMA-JUNIOR, 2008).

A IL-18 parece desempenhar um papel mais seletivo, desde que a proteína ligante, IL-18bp, que a inativa, quando administrada em camundongos com mucosite induzida por irinotecano, previne a migração de neutrófilos, o desenvolvimento de alterações morfológicas intestinais e funcionais (diarreia e motilidade) (FREITAS, 2007; LIMA-JUNIOR, 2008). A IL-33, descrita como membro da família de IL-1 (SCHMITZ *et al.* 2005), parece estar relacionada com o desenvolvimento de uma resposta biológica moduladora, via sinalização do receptor ST2, mas sua participação como mediador na mucosite intestinal ainda não está plenamente estabelecida.

Curiosamente, foi ainda demonstrado que a lesão intestinal relacionada a outro quimioterápico antineoplásico, o 5-Fluorouracil, leva à ativação de outro perfil de mediadores inflamatórios, como Fator Ativador de Plaquetas (SOARES *et al.*, 2011) e IL-1 (SOARES, 2008). O uso de animais *knockout* para o receptor do PAF (Fator de Ativação de Plaquetas) ou do antagonista de receptores de IL-1 (IL-1ra) preveniram o dano e os distúrbios de motilidade intestinais associados a este quimioterápico. Adicionalmente, Wu e colaboradores (2011), demonstraram que o uso do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) foi capaz de diminuir a apoptose nas criptas jejunais, de atenuar as alterações histopatológicas e de reduzir a gravidade da diarreia, em camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil. Entretanto, o mesmo não ocorreu quando da administração de irinotecano (LIMA-JÚNIOR, 2008). Tal observação parece ser um forte indicativo de que o curso de desenvolvimento da mucosite parece ser dependente do tipo de quimioterápico antineoplásico usado.

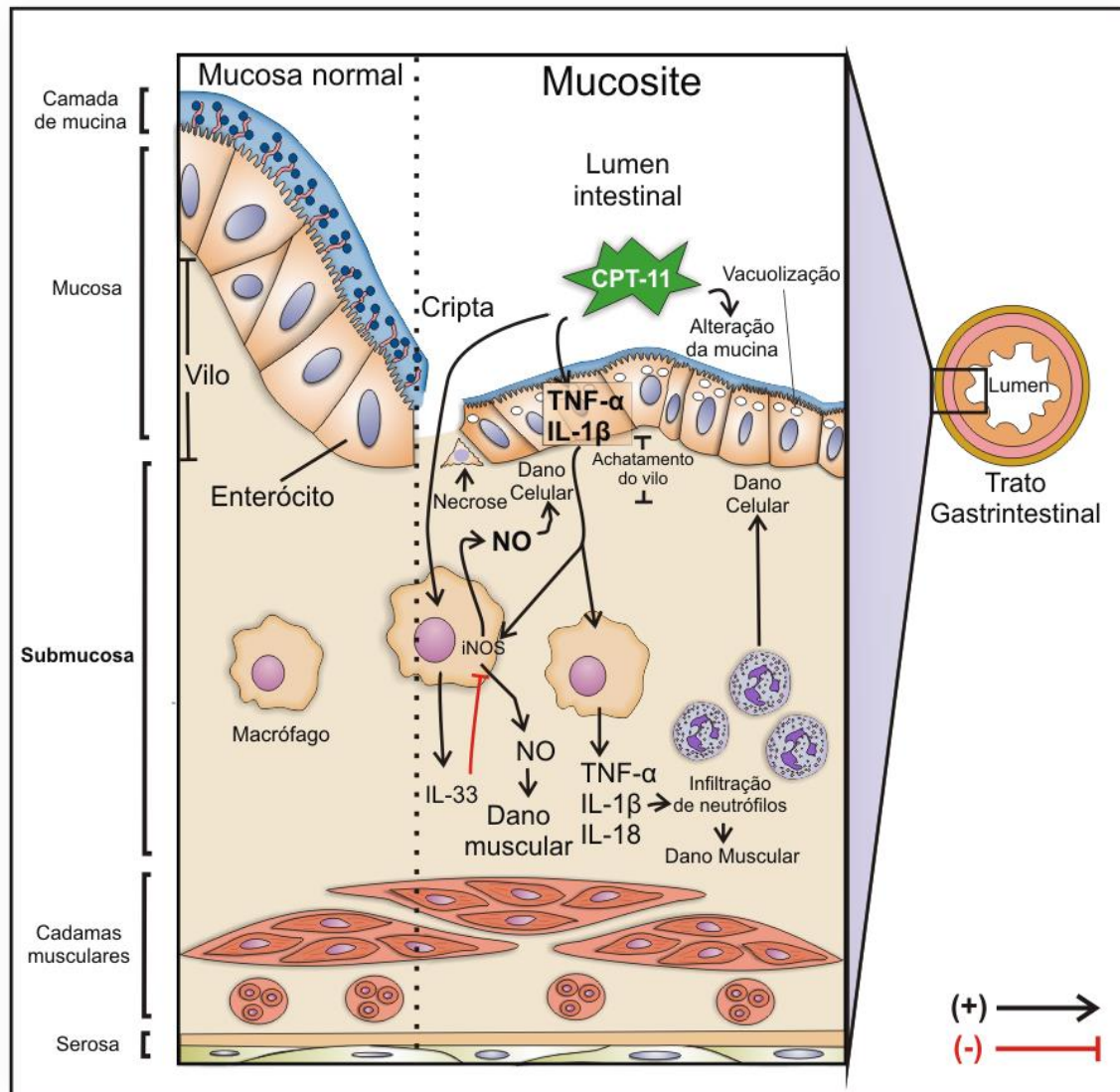
Com relação às alterações histopatológicas foram realizados estudos em amostras de mucosa duodenal, obtida por endoscopia seriada em pacientes em quimioterapia a base de Irinotecano. Keefe e colaboradores (2000) demonstraram que corpos apoptóticos são visíveis nos vilos intestinais a partir das primeiras 24 horas após a quimioterapia, o que precede o subsequente achatamento dos vilos e diminuição da área absorptiva com diminuição do índice mitótico nas criptas. Adicionalmente, a análise temporal feita pelos experimentos de um

grupo australiano comandado por Dorothy Keefe (2010), também mostrou alterações tardias de perda de fibras de colágeno tipo IV em mucosa jejunal e colônica nas fases tardias (96h e 144h) do tratamento com irinotecano (AL-DASOOQI *et al.* 2011). Não há, até este momento, certeza se as alterações da função intestinal são plenamente recuperadas ou se há alterações de longo prazo. O tratamento padrão para mucosite induzida por antineoplásicos é essencialmente paliativo, com suportes analgésico e nutricional.

Tem-se demonstrado que a mudança no microbiota intestinal tem correlação com a toxicidade do Irinotecano. Brandi e colaboradores (2006) mostraram que camundongos germ-free foram mais resistentes à toxicidade do irinotecano que o grupo holoxenico (BRANDI *et al.*, 2006). Nesse contexto, Stringer e colaboradores (2007) evidenciaram que o irinotecano causou mudanças na flora do estomago, jejuno, cólon e fezes de ratos, e essas mudanças foram associados ao desenvolvimento de diarreia. Essas alterações na flora podem favorecer uma infecção sistêmica e, em particular, podem contribuir para o desenvolvimento da mucosite intestinal. Além disso, os autores evidenciaram que as bactérias produtoras de β -glucuronidase encontraram-se aumentadas após a quimioterapia do irinotecano, reativando o SN38 a partir do glicuronideo de SN-38 (SN38G), causando um dano na mucosa intestinal e diarreia (STRINGER *et al.*, 2007b). Estudos com a combinação dos antibióticos Neomicina e Bacitracina têm demonstrado potencial efeito protetor na mucosite induzida por irinotecano (SCHMITTEL *et al.* 2004) e Fluorouracil associado com Irinotecano (ALIMONTI *et al.* 2003).

Assim, o conhecimento adequado da patogênese da mucosite intestinal é fundamental para a busca de meios preventivos e terapêuticos que permitam melhoria significativa da qualidade de vida dos pacientes acometidos, evitando a redução das doses dos quimioterápicos, ou até mesmo a interrupção temporária ou definitiva do tratamento.

FIGURA 7 – Mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal por Irinotecano



Fonte: Ribeiro RA (2011), Memorial Professor Titular em Farmacologia.

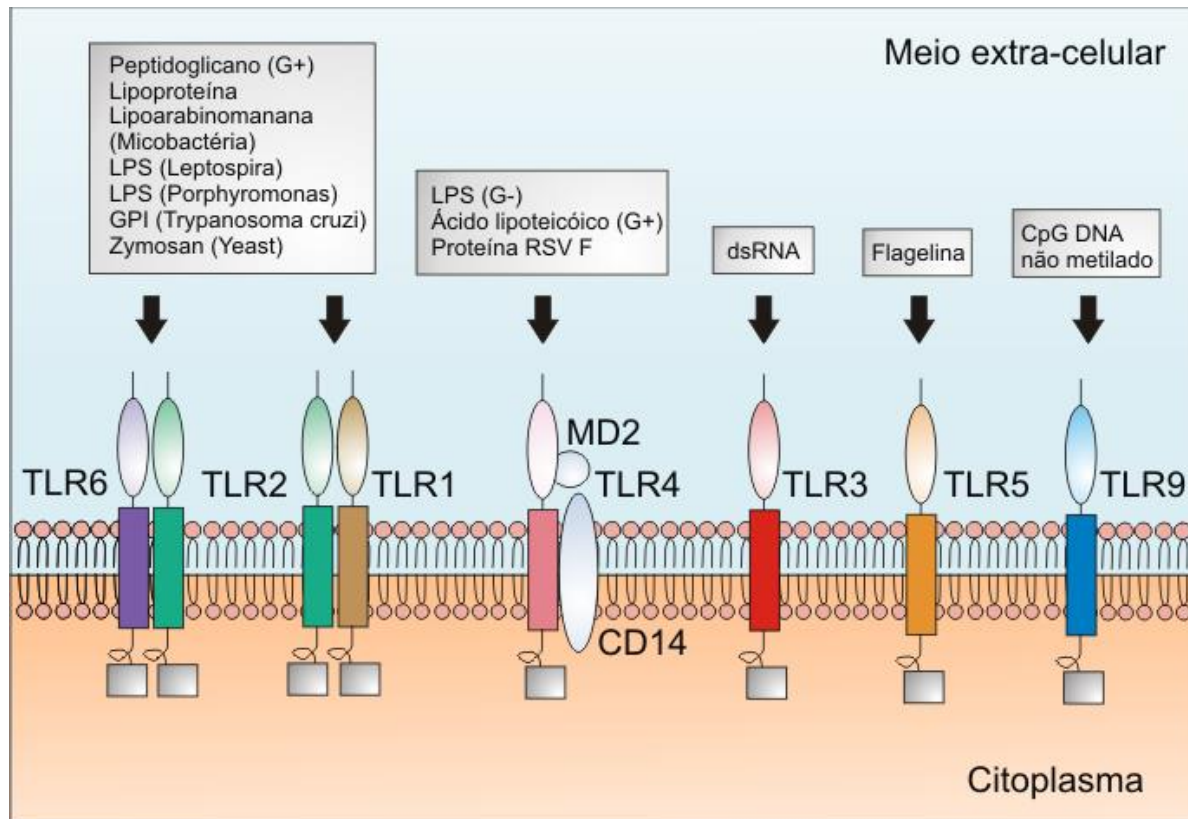
CPT-11: Irinotecano; TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α ; IL-1 β : Interleucina-1 β ; NO – Óxido Nítrico; IL-18: Interleucina-18; IL-33: Interleucina-33; iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzida.

1.4 RECEPTORES TOLL-LIKE

Os receptores Toll-like (TLRs) funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e monócitos/macrófagos. Em geral, reconhecem padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são moléculas endógenas liberadas nos processos de morte celular ou necrose, e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como flagelina, DNA bacteriano, peptidoglicano, RNA viral ou LPS (**Figura 8 e Quadro 3**) (KAWAI & AKIRA, 2009; 2010; TAKEUCHI & AKIRA, 2010). Este processo de reconhecimento dará início à resposta imune inata caracterizada pela secreção de citocinas e quimiocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão. A ação conjunta desses fatores irá estimular e facilitar a migração de células especializadas responsáveis por desencadear a resposta imune adaptativa (AKIRA & TAKEDA, 2004; LIEW *et al*, 2005; ARANCIBIA *et al*, 2007).

Os TLRs são encontrados na membrana citoplasmática ou em compartimentos endossomais intracelulares, estruturalmente os TLRs são classificados como receptores transmembrana e possuem três características comuns; um domínio extra-celular contendo repetições ricas em leucina (LRR), uma região transmembranar curta, e um domínio intracelular homólogo ao do receptor para IL-1 conhecido como TIR (Receptor Toll/IL-1) essencial para a transdução dos sinais (AKIRA & TAKEDA, 2004)

FIGURA 8 – Ligantes específicos para receptores *Toll like*



Os receptores Toll-like (TLR) reconhecem uma variedade de Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O reconhecimento do TLR4 requer duas proteínas acessórias: CD14 e MD2. O TLR2 reconhece uma ampla quantidade de ligantes não relacionados estruturalmente e funciona em combinação com outros (mas não todos) receptores Toll, incluindo TLR1 and TLR6. TLR3 está envolvida no reconhecimento de fita-dupla (dsRNA). TLR5 é específico para flagelina bacteriana, enquanto TLR9 é o receptor para CpG não metilado, que são abundantes no DNA bacteriano. LPS: Lipopolisacárido. G-: Gram negativa. G+: gram positivas. Proteína F RSV: Proteína F do vírus sincicial respiratório. CpG DNA: DNA bacteriano. Fonte: Adaptado de MEDZHITOV, 2003. *Nature Reviews Immunology*, 1: 135-145, 2003.

Esses receptores foram inicialmente identificados em moscas *Drosophila melanogaster*, nas quais tem um papel na embriogênese e na imunidade contra infecções fúngicas (HASHIMOTO *et al*, 1988; MEDZHITOV, 2001). O primeiro relato de receptores semelhantes à Toll (Toll like receptors, TLR) em humanos foi em 1994 por Nomura e colaboradores. A família dos receptores do tipo Toll compreende, até o momento, treze proteínas identificadas em mamíferos (13 receptores identificados em camundongos e 11 receptores em humanos) (KAWAI & AKIRA, 2009).

Os receptores Toll-like e a família dos receptores da interleucina 1 (IL-1Rs), incluindo IL-1R e IL-18R, apresentam homologia em sua região citoplasmática, conhecida como

domínio Toll/IL-1R (TIR) (**Figura 9**) (SLACK *et al*, 2000; AKIRA & TAKEDA, 2004). Apesar desta similaridade, a porção extracelular de ambos receptores é estruturalmente diferente. Os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 estão presentes na membrana plasmática, de modo que eles contêm um domínio intracelular, constituído de proteínas do tipo TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM), e um extracelular (repetições ricas em leucina, LRR). Entretanto, os TLRs 3, 7, 8, 9 e 10 estão localizados intracelularmente (AHMAD-NEJAD *et al*, 2002).

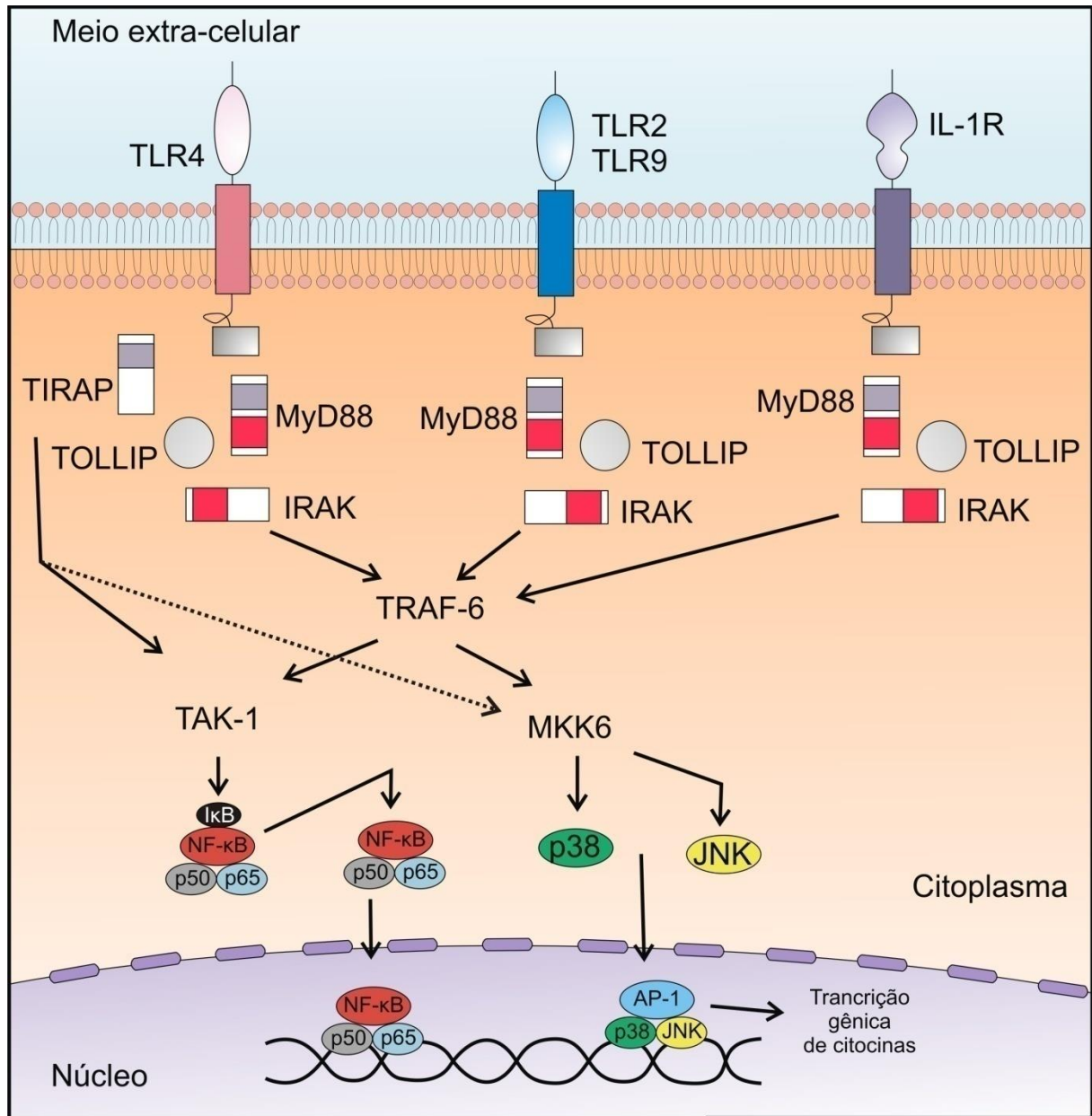
O domínio TIR é requerido para iniciar a geração dos sinais intracelulares, sendo que a proteína MyD88 está presente em todos os receptores, exceto no TLR3 (AKIRA & TAKEDA, 2004; McGETTRICK & O'NEILL, 2010). Este domínio inicia o recrutamento do gene adaptador primário da resposta mieloide (MyD88) e a consequente ativação da família de receptores de IL-1 associado a quinases (IRAK). A ativação da IRAK induz a liberação de serina e treonina quinases responsáveis pela degradação do I κ B α (inibidor de NF- κ B). A diminuição das concentrações citoplasmáticas I κ B α permite que o fator de transcrição NF- κ B, se desloque do citoplasma para o núcleo, uma vez no núcleo da célula, o NF- κ B interage com genes κ B dependentes, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios importantes para a resposta imune (**Figura 9**) (TAKEDA *et al*, 2003; AKIRA & TAKEDA, 2004).

QUADRO 3 – Receptores Toll-like e seus principais ligantes

Receptor	Ligante	Origem do ligante
TLR1	Triacil Lipopeptídeos Fator solúvel	Bactérias e micobactérias <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteínas/Lipopeptídeos Peptidoglicano Ácido lipoteicóico Lipoarabinoman Modulin fenol solúvel Fosfolipídios glico Inositol Glicolípídeo Lipopolissacarídeo atípica Lipopolissacarídeo atípica Zimosan Proteína de choque térmico 70	Vários patógenos Bactéria gram positiva Bactéria gram positiva Micobactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungos Hospedeiro
TLR3	RNA de dupla hélice	Vírus
TLR4	Lipopolissacarídeo Taxol Proteína de Fusão Proteína de choque térmico 60 Proteína de choque térmico 70 Oligossacarídeos de ácido hialurônico Fibrinogênio	Bactéria gram negativa Plantas Vírus sincicial respiratório <i>Chlamydia pneumoniae</i> Hospedeiro Hospedeiro Hospedeiro
TLR5	Flagelina	Bactéria
TLR6	Diacil lipopeptídeos Ácido lipoteicóico Zimosan	<i>Mycoplasma</i> Bactéria gram positiva Fungos
TLR7	Imidazoquinolina Loxoribina RNA de dupla hélice	Compostos sintéticos Compostos sintéticos Vírus
TLR8	Imidazoquinolina RNA de dupla hélice	Compostos sintéticos Vírus
TLR9	DNA contendo CpG	Bactérias e vírus
TLR10	N.D	N.D
TLR11	N.D	Bactérias uropatogênicas

Fonte: AKIRA & TAKEDA, 2004. *Nat Rev Immunol*, 4: 499-511, 2004. TLR: Receptores Toll-like. N.D: não determinado

FIGURA 9 – Via de Sinalização dos Receptores Toll-like



Os Receptores Toll Like (TLR) e a família de Receptores da IL-1 apresentam diversos componentes da sinalização, incluindo o adaptador MyD88, proteína de interação do Toll (TOLLIP), a proteína quinase IRAK e TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF). TRAF6 pode ativar o fator nuclear- κ B (NF κ B) através de TAK1 e JNK e p38 MAP quinase através de MKK6 (Proteína quinase 6 ativada por mitógenos). TLR4 sinaliza através de outra proteína adaptadora além do MyD88. TIRAP (Domínio de homologia dos receptores Toll/Interleucina-1 que contem a proteína adaptadora) que ativa a sinalização do TLR4 independente de MyD88. TLR: Receptor Toll-like, MyD88: Fator de diferenciação mieloide 88, IRAK: Kinase associada ao receptor da IL-1, TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF, JNK: Proteína kinase c-Jun NH₂-terminal. Fonte: Adaptado de MEDZHITOV, 2003. Nature Reviews Immunology, 1: 135-145, 2003.

O TLR2 reconhece componentes de uma grande variedade de microorganismos. Estes incluem lipoproteínas de patógenos, tais como bactérias gram-negativas, *Mycoplasma* e *Shigella*, peptidoglicano e ácido lipoteicóico de bactérias gram positivas, entre outros (**Quadro 3**). Assim como o TLR4, o TLR2 também reconhece LPS, no entanto este último reconhece LPS atípicos, os quais não são identificados por TLR4 (NETEA *et al*, 2003)

O receptor Toll-like tipo 4 (TLR4), o qual forma um complexo membranar com as proteínas CD14 e MD-2, é ativado pelo PAMP, Lipopolissacarídeo (PARK *et al.*, 2009), iniciando uma sinalização de um domínio intracelular TIR (Toll/Receptor IL-1) via moléculas adaptadoras, predominantemente MyD88 (Fator de diferenciação mieloide 88) (O'NEIL & BOWIE, 2007). Cinco das seis cadeias lipídicas do LPS se ligam a MD2 e a cadeia lipídica remanescente associa-se ao TLR4 a homodimerização e a fase inicial da ativação (KAWAI *et al*, 2010).

O TLR9 é responsável pelo reconhecimento de dinucleotídeo CG não metilados de DNA bacterianos (CpG DNA). O DNA bacteriano é bem conhecido como estimulador de resposta imune e esta atividade imunoestimulatória é atribuída à presença de CpG não metilados. Estes CpG são reconhecidos pelo TLR9 na superfície celular estimulando a maturação de células dendríticas, a produção de macrófagos e células NK bem como um aumento na expressão gênica do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II, CD40, CD80, CD86, os quais são marcadores de superfície de células dendríticas maduras (ASHKAR & ROSENTHAL, 2002). O uso de oligodesoxinucleotídeos sintéticos (ODNs) que contém CpG não metilados, em modelos animais mostrou que estes componentes também ativam células imunes e estimulam potentes respostas por parte do sistema imune Th1, o qual protege o organismo contra uma variedade de doenças de natureza imunológica. Por isso, o CpG DNA pode ser clinicamente útil como um adjuvante em uma grande variedade de vacinas contra doenças infecciosas, câncer e doenças alérgicas (WAGNER, 2002).

Sugere-se que os mecanismos regulados por TLRs possam ter participação fisiopatológica em uma gama de desordens, incluindo doenças autoimunes, alérgicas ou infecciosas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Estudos mostram, que os receptores Toll-like estão envolvidos em vários distúrbios gastrintestinais, tais como doença celíaca (THOMAS *et al*, 2006), doença inflamatória intestinal (FRANCHIMONT *et al*, 2004), câncer de cólon (CLEVERS, 2004) e colite infecciosa (UEMATSU *et al*, 2006).

O MyD88 (do inglês “*myeloid differentiation factor 88*”) é uma molécula adaptadora utilizada pela maioria dos TLRs, com exceção do TLR3 que utiliza a TRIF, assim como utilizada pela família de receptores da IL-1 (IL-1R).

Existem duas cascatas de sinalização, uma dependente de MyD88 e outra MyD88 independente. Na primeira via, o domínio TICAM (do inglês “*Toll Interleukin-1 receptor-containing adapter molecule*”) se associa à molécula adaptadora MyD88, comum a quase todos os TLR, que leva à ativação da expressão de centenas de genes da resposta inflamatória induzidos pelo fator de transcrição NF κ B (KAWAI *et al*, 1999; TAKEUCHI *et al*, 2000).

Os receptores TLR3 e TLR4, entretanto, são capazes de ativar a via de sinalização independente do adaptador MyD88, que é mediada pelas moléculas adaptadoras TRIF e TRAM, com resultados distintos. Esta via é capaz de induzir a fosforilação de elementos reguladores de interferon (IRFs), como IRF-3 e IRF-7, culminando na síntese de interferons do tipo I, tais como IFN- α e β . Outra característica desta via é a indução de NF κ B tardiamente, em um processo mediado pela proteína cinase RIP-1 (YAMAMOTO *et al*, 2000; UEMATSU & AKIRA, 2007).

A proteína adaptadora, MyD88 tem sido descrita ter um papel importante na fisiopatologia de várias doenças, tais como a colite induzida por *Clostridium difficile* (JARCHUM *et al*, 2012) e sepse (CASTOLDI *et al*, 2012).

1.5 RECEPTORES NOD-LIKE

Os Receptores Nod-Like (NLRs) são sensores intracelulares importantes para o desenvolvimento da imunidade inata. Os receptores NLRs têm como característica peculiar sua localização citosólica, a presença destes receptores no interior das células sugere a existência de uma segunda linha de defesa capaz de ativar a resposta imune inata caso haja a passagem de um agente patogênico através das barreiras primárias localizadas no meio extracelular e pelos receptores TLRs localizados na membrana citoplasmática dos enterócitos (INOHARA *et al*, 2003; INOHARA & NUNEZ, 2003)

Os receptores NLRs compreendem uma grande família de PRRs intracelulares caracterizada pela presença de um NOD (*Nucleotide binding and Oligomerization Domain*)

conservado. Estudos recentes demonstraram a existência de 23 genes de NLRs diferentes no genoma humano. Em ratos, até o momento, foram descobertos 34 NLRs diferentes (Revisto por KANNEGANTI, LAMKANFI, NÚNEZ, 2007)

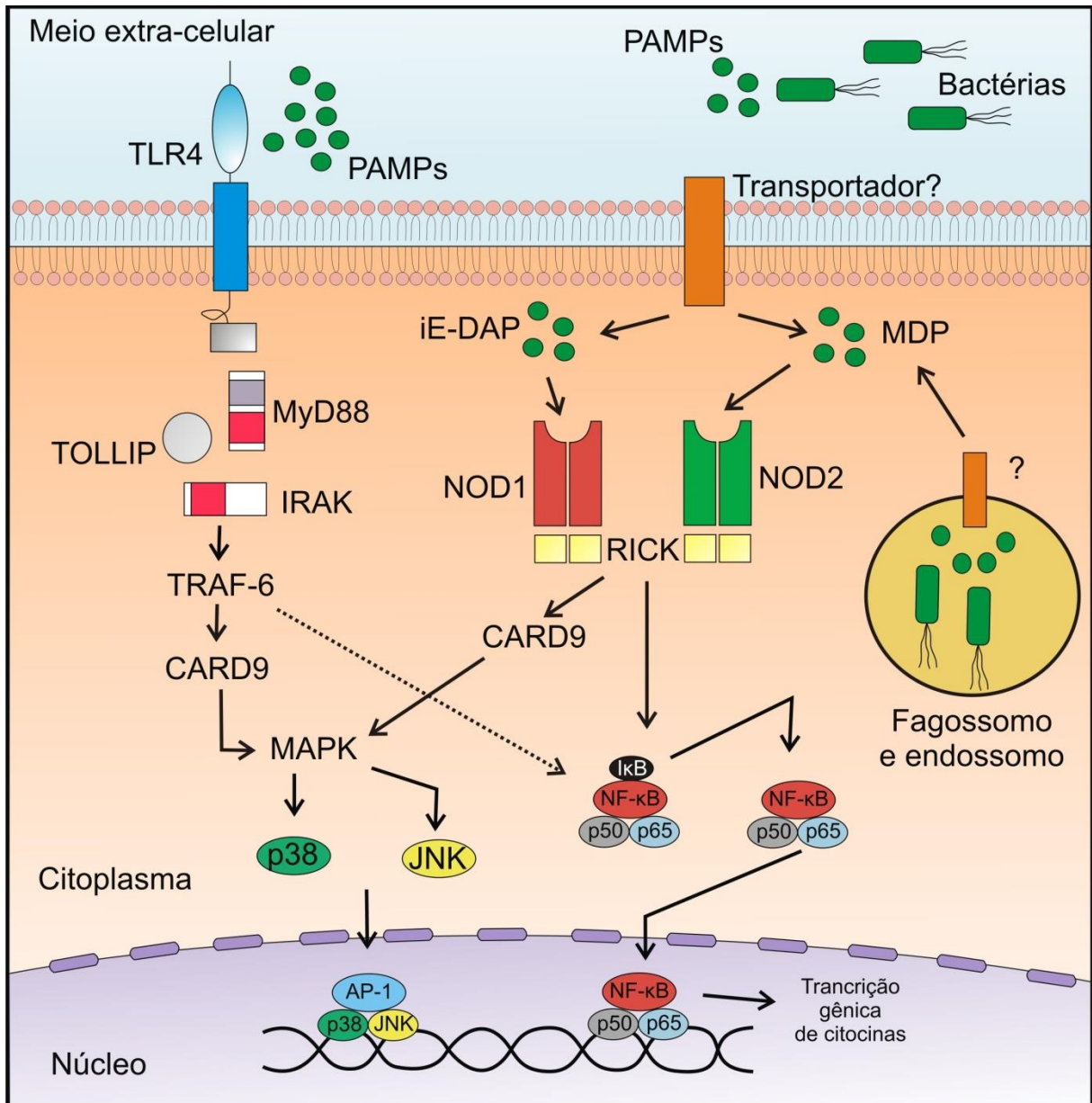
Os primeiros receptores NOD identificados foram NOD1 e NOD2. Ambos receptores reconhecem muropeptídeos derivados de peptídeoglicana, um dos principais componentes da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas (CHAMAILLARD *et al*, 2003; INOHARA *et al*, 2003). Enquanto, NOD2 detecta muramyl dipeptídeo (MDP), o reconhecimento de peptídeoglicano bacteriano por NOD1 é dependente da presença do dipeptídeo iE-DAP (Ácido γ -D-glutamil-*meso*-dia-minopimelico), um aminoácido característico presente na parede celular principalmente de bactérias Gram negativas (por exemplo, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*) (FRANCHI *et al*, 2009)

A ativação resultante do contato dos receptores NOD-1 e NOD-2 com o iE-DAP ou MDP provoca uma rápida resposta envolvendo a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- κ B, MAPK ou Caspase-1 e consequente expressão de mediadores inflamatórios que estimularam a resposta imune inata e adaptativa (**Figura 10**) (INOHARA *et al*, 2003; INOHARA & NUNEZ, 2003).

Entre esses receptores, destacam-se um conjunto de proteínas que regulam a ativação de caspase-1, entre elas, Cryopyrin, ASC, IPAF e NAIP 1. Tais proteínas são capazes de se ligar a caspase-1 induzindo a formação de uma plataforma molecular, denominada de inflamossoma, que é fundamental para induzir a produção de citocinas através da clivagem das pró-IL-1 β e IL-18 na sua forma ativa. A IL-1 β promove ativação endotelial com consequente recrutamento celular, enquanto que a IL-18 promove amplificação da resposta TH-1 estimulando a ativação de uma resposta inflamatória mais intensa (Revisto por KANNEGANTI, LAMKANFI, NÚNEZ, 2007).

Os TLRs e NLRs apresentam semelhanças na sua estrutura e componentes, e interagem a nível de sinalização. Por exemplo, após ativação da caspase-1 pela via do inflammassoma, as citocinas IL-1 β e IL-18 atuam através dos seus receptores. Estes, tal como os TLRs, possuem um domínio TIR e usam a via MyD88. Há, assim, uma cooperação entre as vias dos TLRs e os inflammassomas.

FIGURA 10 – Via de Sinalização dos Receptores NOD1 e NOD2



As proteínas dos receptores Nod-like (NLR), NOD1 e NOD2 são ativadas por sensores intracelulares iE-DAP and MDP, respectivamente, levando ao recrutamento de proteínas adaptadoras RICK e CARD9. PAMPs intracelulares são reconhecidos pelos receptores Toll-like (TLRs), que sinaliza através de MyD88, IRAK e TRAF. Subsequente ativação de NF-κB e MAP quinase resulta na transcrição de genes pró-inflamatórios. Fonte: Modificado de KANNEGANTI *et al*, 2007.

JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das doenças mais incidentes no mundo, sendo a segunda causa de óbito. Estima-se que em 2030 existam 75 milhões de sobreviventes a esta doença, muitos sofrendo os efeitos colaterais da terapia antitumoral. Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia mais prevalente em todo o mundo e responsável por cerca de 8% das mortes relacionadas ao câncer. O irinotecano, utilizado nos protocolos de primeira e segunda linha terapêutica para o CCR metastático, pode causar, como efeito colateral relevante, mucosite intestinal e diarreia. Este último apresenta-se clinicamente na forma mais grave em um quarto dos pacientes, comprometendo a eficácia do tratamento, aumentando os custos com da terapia e apresentando um grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes. Uma importante repercussão da mucosite e da diarreia é que os pacientes podem evoluir para um quadro clínico de sepse e risco à vida do paciente. Assim, sabendo-se que a sepse cursa com uma translocação bacteriana e desenvolvimento de uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica, no presente trabalho objetivamos investigar o papel de receptores envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a esses microorganismos no desenvolvimento da mucosite intestinal. Acredita-se que, por meio do conhecimento da patogênese dessa doença, ações preventivas e terapêuticas mais adequadas possam ser implementadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

- Estudar os mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano e seu metabólito ativo, SN38.

2.2 Específicos:

- Avaliar a excreção de açúcares e eletrólitos em camundongos com mucosite intestinal induzida por irinotecano.
- Avaliar a translocação bacteriana e identificar os possíveis micro-organismos traslocados aos órgãos periféricos tais como Linfonodo mesentérico e Fígado na mucosite induzida por irinotecano
- Avaliar a participação da proteína adaptadora MyD88, Receptores Toll-like tipo 2, 4 e 9 e receptores NOD1 na mucosite induzida pelo irinotecano.
- Avaliar o potencial lesivo da injeção local do SN-38 sobre o intestino de camundongos. Assim como avaliar as alterações morfológica do SN38 em células Epiteliais Intestinais de rato (IEC-6).

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada”. (Cora Coralina)

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, pesando entre 20 e 25g. Estes animais eram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Adicionalmente, utilizaram-se camundongos *knockout* para receptor *Toll-like* tipo 4 (TLR4^{-/-}); TLR9^{-/-}, TLR2^{-/-}, assim como para a proteína adaptadora MyD88^{-/-} e NOD1^{-/-} machos, pesando entre 20 e 25 g, originalmente obtidos pelo Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA), criados e fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

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

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

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 99/10.

3.3 APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORAIS

- Agitador Vortex – Cetomart MV
- Autoclave
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AI200
- Banho-Maria BM100, Fanem
- Bomba Perfusora 900, Holter Holler. Extracorporeal Medical Specialties, King of Prussia, PA, EUA
- Câmera de contagem Neubauer
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- Contador Automático de Células - Colter
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas - ELISA ELX800, Biotek
- Espectrofotômetro UV-VIS,
- Fotômetro de chama 443, Instrumentation laboratory, Lexington, EUA
- Freezer -80°C, Thermo Scientific
- Fluxo Laminar
- Gaiola metabólica em inox
- HPLC c/coluna de troca iônica com software analisador de Carboidrato BioLC, Dionex
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8
- Estufa Incubadora de CO₂
- Lâmina lisa para microscopia 26 x 76 mm
- Lamínula 24 x 32 mm
- Lamínula circular 13 mm
- Material cirúrgico
- Medidor de pH, Hanna Instruments HI 8519N
- Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- Microscópio óptico de invertido Nikon Diaphot
- Microscópio Confocal, Olympus
- Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000 µL

-
- Micropipeta Multicanal Gilson 200 μ L
 - Pipetas sorológicas de 1, 5 e 10 mL
 - Placa estéril de 24 e 96 poços
 - Tubos de Falcon 15 e 50 mL

3.4 DROGAS, SOLUÇÕES E CORANTES

3.4.1 DROGAS

- Cloridrato de Irinotecano (Evoterin®, ampolas 5mL, 100mg/mL, Evolabis)
- Cloridrato de Doxorubicina (Evorubicin®, ampola 10 mg de pó liofilizado, Evolabis)
- SN38 Metabólito ativo do Irinotecano (TOCRIS®, pó liofilizado diluído em DMSO-100Mm)
- 5-Fluouracil
- Tóxina da Cólera (0,5 μ g/ μ L) foi gentilmente cedido pelo Prof. Aldo Lima.
- Cloridrato de Xilazina 2% (Frasco ampola 10mL, Kensol®)
- Cloridrato de Quetamina 10% (Frasco ampola 10mL, Kensol®)
- Tribromoetanol 2,5%

3.4.2 SOLUÇÕES

- Avidina-Peroxidase (Dako)
- Água destilada
- Água Mili-Q
- Álcool 70%
- Anticorpo primário policlonal anti-TLR4 (Santa Cruz)
- Caldo BHI (Brain Heart Infusion)
- Diaminobenzidina –DAB (Dako)
- Dimetil Sulfoxido (DMSO) a 100% (Merck)
- Fenolsultaleina (PSP)
- Kit Bioquímico para Enterobacterias (Probac®)
- Meio de cultura DMEM (Sigma)
- Meio Agar BHI

-
- Meio Agar Muller Hinton
 - MTT 5mg/mL (Sigma)
 - o-dianisidina (Sigma)
 - Paraformaldeído 4% (PFA)
 - Peróxido de Hidrogênio 30% (Sigma)
 - Salina tamponada com fosfato (PBS)
 - Solução salina estéril (NaCl 0,9%).
 - Solução de Açúcares contendo 250 mg/L de Lactulose e 50 mg/L de manitol (IBIMED)
 - Soro Bovino fetal (Sigma)
 - Tampão fosfato de potássio
 - Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)
 - Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma)

3.4.3 CORANTES

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

3.5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais C57BL/6 foram divididos em grupos (n=6-7).

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

Grupo II: animais injetados com Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) sacrificados no 5 dia;

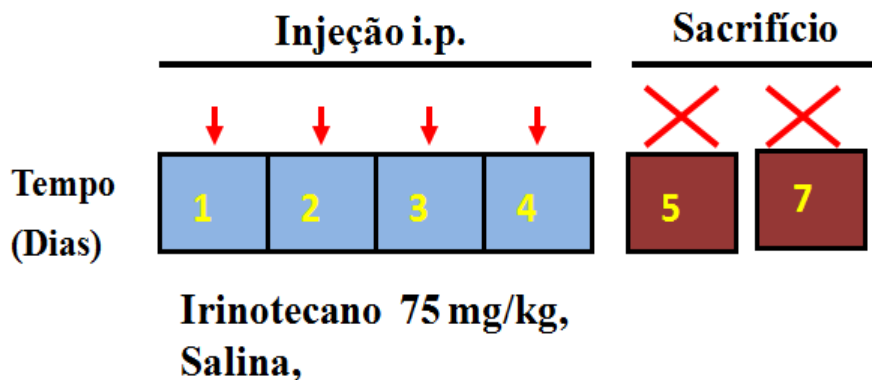
Grupo III: animais injetados com Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) sacrificados no 7 dia;

3.5.2 INDUÇÃO DA MUCOSITE INTESTINAL

A mucosite foi induzida de acordo com protocolo desenvolvido por Ikuno *et al.*, (1995) e adaptado por Melo *et al.*, (2007) e Lima-Júnior *et al.*, (2012) para as condições experimentais do laboratório. Os animais C57BL/6 receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de Irinotecano (Evoterin[®] - Evolabis), na dose de 75 mg/kg, ou salina (5

mL/kg), uma injeção por dia e avaliados no 5º e 7º dia após a primeira administração (**Figura 11**).

FIGURA 11 – Esquema de indução da mucosite intestinal



Camundongos C57BL/6 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 (Lima-Júnior *et al.*, 2012) e 7º (Melo *et al.*, 2007) dia após a primeira administração do antineoplásico. X: sacrifício. i.p: intraperitoneal.

3.5.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DE INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO

a) Avaliação Ponderal

Os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em % de variação da massa corpórea.

b) Avaliação do Grau de Diarreia

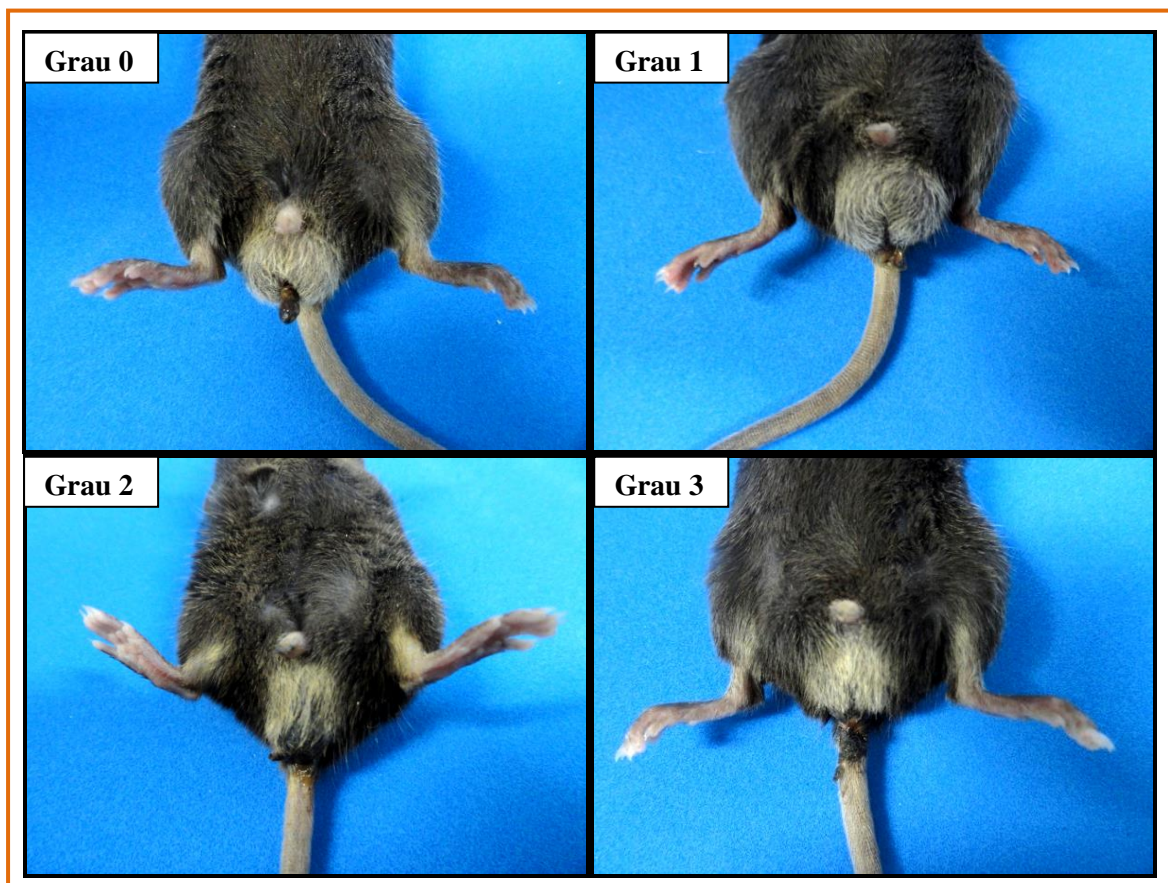
Aos eventos de diarreia, apresentados no quinto e sétimo dia após o início do tratamento dos animais com Irinotecano, foram atribuídos escores (segundo proposta de Kurita *et al.*, 2000), como discutido no **Quadro 4**. Esse parâmetro representou um indicativo de indução da mucosite, tendo em vista a associação do sinal diarreia à mucosite, observada na prática clínica (**Figura 12**).

Quadro 4 – 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 12 - Avaliação dos escores de diarreia pós-injeção do Irinotecano em camundongos C57BL/6



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

c) 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 realizou-se a contagem de leucócitos totais no contador automático de células (Coulter Ac.T). Os resultados foram expressos como número de células $\times 10^3/\mu\text{L}$. Adicionalmente, a contagem do número total de leucócitos foi realizada em todos os experimentos com o auxílio da câmera de Neubauer. Essa observação serviu como controle do efeito imunossupressor do irinotecano sobre o animal.

d) Histopatologia e Morfometria do Intestino Delgado e Colón

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, foi removido um segmento de 0,5 cm do duodeno, jejuno, íleo e colón 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 e a severidade da mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores proposto por Woo *et al.* (2000), descrito no **Quadro 5**.

Quadro 5 – 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 contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta.
Escore 3	Mais de 10% das criptas contêm 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

Para análise morfométrica, objetivou-se obter a medida de vilos, considerada desde o ponto de encontro entre dois vilos até o topo do vilos em questão (altura do vilos), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre dois vilos medidas até a o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade absorptiva (razão altura dos vilos/profundidade das criptas e área do Vilos). A razão entre o comprimento dos vilos intestinais e as criptas de Lieberkühn, assim, como área do vilos foi calculada em μm utilizando-se o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilos e criptas por corte histológico, em microscopia óptica 100x (Microscópio Nikon com objetiva 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x).

Na avaliação histológica do colón utilizou-se escores proposto por Wu *et al.* (2010) descritos no **Quadro 6**.

Quadro 6 – Escore de Análise histopatológica para cólon

Escore	Escores Histopatológicos
Escore 0	Ausência de inflamação
Escore 1	Baixo grau de infiltração de leucócitos
Escore 2	Moderado grau de infiltração de leucócitos
Escore 3	Elevado grau de infiltração de leucócitos
Escore 4	Semelhante a 3, porém com maior perda das criptas de Lieberkühn

Fonte: Wu *et al.* 2010

e) Determinação da infiltração de neutrófilo através da atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino (jejuno, íleo e cólon) e pulmão de animais após a indução da mucosite por Irinotecano foi determinada pelo ensaio da atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado. Uma porção de intestino e pulmão (previamente perfundido com salina) foram coletadas e incubadas em 200µL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*) com 1000 µl de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o "*pellet*" foi ressuspensão em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante do intestino foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H₂O₂ (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4 M.

Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1×10^5 neutrófilos/ poço/ 50 μ L). Determinou-se a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

f) Mensuração da temperatura retal ($^{\circ}$ C) em camundongos

Realizou-se a mensuração da temperatura retal com o auxílio de um termometro digital, previamente calibrado, em camundongos injetados com salina ou irinotecano no quinto e sétimo dia experimentais.

3.5.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS DA BARREIRA INTESTINAL APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO

a) Avaliação da Permeabilidade Intestinal

Para este estudo, a função da barreira intestinal foi avaliada através do teste de permeabilidade intestinal utilizando à taxa de excreção urinária dos açúcares lactulose/manitol (L/M), a mesma tem sido usada com segurança na prática clínica e experimental (LIMA *et al.*, 2005; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004). A lactulose é um dissacarídeo sintético, o qual atravessa a mucosa intestinal quando a mesma encontra-se lesada. Já o manitol, difunde-se através dos poros hidrofílicos da mucosa intestinal. Após absorção ambos os açúcares são eliminados por via renal sem alterações, possibilitando a mensuração destes na urina.

Inicialmente, os camundongos C57BL/6 foram condicionados em gaiolas metabólicas durante 72 h antes da primeira injeção do Irinotecano, com o objetivo de adaptar os animais ao sistema da gaiola metabólica. Em seguida, os camundongos receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e realizou-se a coleta de Urina no quinto e sétimo dia experimental. Os animais receberam ração pobre em carboidratos durante 72h antes da gavagem de Lactulose/manitol. No quarto (Protocolo 5 dia) e sexto (Protocolo 7 dia) dia experimental realizou-se a gavagem de 0,25 mL/camundongo da solução contendo lactulose (250 mg/L) e manitol (50 mg/L). Após 24 horas da gavagem, coletaram-se amostras

de urina, e uma alíquota (50 µl de urina) foi utilizada para quantificação dos açúcares através de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC - PAD), para obtenção dos cromatogramas e da taxa de excreção de lactulose/manitol.

b) Perfusão Intestinal

Os animais foram divididos em grupos (n=6) e mantidos em jejum de 12 horas, com livre acesso à água antes do experimento. A perfusão intestinal foi realizada em alças ileais, as quais foram ligadas quando da anestesia com quetamina (35 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) para abertura (3-5 cm) do abdômen e visualização do intestino delgado. O segmento terminal do íleo foi lavado com 1 mL de PBS. Ambas as terminações proximal e distal do segmento isolado foram canuladas para infusão da solução perfusora e coleta do perfusato, respectivamente. As cânulas foram de polivinil, com diâmetros interno de 0,0892 cm, externo de 0,2619 cm, de parede de 0,8636 cm (ColePalmer, Niles, IL, EUA). As soluções perfusora Ringer modificada (pH=7,4) foram aquecidas a 37°C, em banho-maria, e infundidas (0,11 mL/min) com o auxílio de uma bomba peristáltica perfusora (900 Holter Roller). A perfusão intestinal foi realizada durante 60 min e com coleta do perfusato a cada 15 min, contendo fenolsultaleína (PSP, 50 mg/ml) como marcador não absorvível. Ao final do experimento, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, e coletadas as alças perfundidas, as quais foram pesadas para obtenção do peso úmido e posteriormente secadas em estufa (90°C/72 horas). Após secagem as alças foram novamente pesadas para obtenção do peso seco, para os cálculos de fluxos, com determinações eletrólitos e concentrações de PSP. A PSP foi determinada em espectrofotômetro. As concentrações de sódio, potássio e cloreto foram determinadas em fotômetro de chama (LIMA *et al*, 2002; BRAGA-NETO *et al*, 2010).

c) Avaliação da Função renal

Para avaliar a função renal dos animais tratados com Irinotecano realizou-se a dosagem de creatinina e ureia plasmática. Os camundongos C57BL/6 foram anestesiados com tribromoetanol e amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro. Em seguida, o sangue total, sem anticoagulante, foi centrifugado a

2500 rpm por 10 min e obteve-se o soro. As amostras de soro foram usadas para a dosagem da ureia e creatinina, utilizando os kits bioquímicos (Labtest®) e a leitura em espectrofotômetro UV-VIS.

3.5.5 AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA, TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL LIKE 4 APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO

a) Bacteremia e Ensaio de Translocação Bacteriana

Para avaliar a bacteremia, os animais foram anestesiados com tribromoetanol e realizados a coleta do sangue do plexo retro-orbital, em condições estéreis. Em seguida, foi adicionado 100 µL de sangue em 5 mL de caldo enriquecido de Infusão de cérebro e coração (BHI) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C. Após 24 e 48 h, avaliou-se o crescimento bacteriano, indicada pela turvação do caldo BHI. A identificação de micro-organismos presentes foi realizada pela coloração de Gram. Os resultados foram expressos como negativo (-), sem crescimento bacteriano ou como positivo (+). Posteriormente, foi semeada 10 µL do hemocultivo nas placas contendo meio Agar BHI. Os meios foram semeados a 37°C, por 48 horas. Realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os resultados foram expressos como Log UFC/mL.

No ensaio de Translocação bacteriana empregaram-se técnicas de assepsia para remover órgãos estéreis tais como Linfonodo Mesentérico (LFM) e fígado. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical no quinto e sétimo dia do início da administração do Irinotecano para a coleta de LFM e fígado. Os órgãos foram pesados e homogeneizadas em 1 mL de salina estéril e 100 µL do homogenato foram semeados em meio de enriquecimento de Infusão de Cérebro e Coração (BHI). Os meios foram incubados aerobicamente em estufa bacteriológica a 37°C. Após 48 horas de incubação, realizou-se a contagem das Unidades Formadoras de Colônias. As colônias crescidas no meio foram observadas macroscopicamente e foi realizada bacterioscopia pelo método de Gram de cada morfotipo colonial. As que apresentaram características morfo-tintorial de bacilos gram negativos,

procedeu-se a identificação bioquímica. Utilizaram-se probas bioquímicas da Probac do Brasil® (Enterokit B) para identificação de enterobactérias (produção de gás, H₂S, urease, citrato, L-triptofano desaminase, motilidade, indol, lisina descarboxilase, fermentação da lactose) e teste de oxidase para à confirmação de Bactérias gram negativas não fermentadoras (BGNNF).

Adicionalmente, foi coletado o exsudado peritoneal ao final da remoção do linfonodo mesentérico e semeado em caldo BHI, com o objetivo de descartar possível contaminação do peritônio por microperforação do intestino. Os animais que apresentem crescimento bacteriano do exsudado peritoneal foram excluídos do ensaio de Translocação bacteriana. Os resultados foram expressos como Log UFC/g. de tecido (TSUJI *et al*, 2003; STRINGER *et al*, 2007a).

b) Imunohistoquímica para o Receptor Toll-Like 4 (TLR4) no intestino da camundongos C57BL/6

Os animais receberam salina ou Irinotecano e sacrificados por deslocamento cervical no quinto e sétimo dia experimental. Amostras de Íleo foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70%. Posteriormente foram desidratas em álcool e xilol, e então parafinizadas. Os tecidos foram cortados em 5 µm de espessura com o auxílio de um micrótomo. As seções de tecidos foram montadas em lâminas silinizadas especiais para imunohistoquímica.

As peças histológicas foram desparafinizadas e em seguida hidratadas. Após a hidratação as peças foram imersas em tampão citrato 0,1 M (pH 6.0), seguida da ativação antigênica (~100 °C por 18 min). Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 15 min. Em seguida, as secções foram incubados o anticorpo primário policlonal *goat* anti-TLR4 (1:400, Santa Cruz Biotechnology) diluído em PBS – BSA 5%, overnight a 4°C. O controle negativo (background) não recebeu anticorpo primário. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas (30 min) com o anticorpo secundário biotilado Donkey Anti-goat diluído em PBS-BSA 5% na proporção de 1:400. Após a remoção do anticorpo biotilado, com lavagem em PBS as lâminas foram incubadas por 30 min com o complexo ABC (Horseradish Peroxidase Standard). Realizou-se a coloração com

diaminobenzidina-peróxido (DAB-H₂O₂) por 1 min. Removeu-se o DAB/ H₂O₂ com H₂O destilada e realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Finalmente, foi realizada a desidratação e montagem das lâminas (RIBEIRO *et al*, 2002).

3.5.6 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA ADAPTADORA MYD88, RECEPTORES TOLL LIKE E NOD1 NA MUCOSITE INDUZIDA PELO IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

Na avaliação do papel da proteína adaptadora MyD88, receptores Toll-like e NOD1 foram avaliados os parâmetros gerais de indução da mucosite, descrita na seção 3.5.3. Assim como, a contagem de bactérias no sangue e no fígado nos animais *knockout* e seus respectivos camundongos selvagens (WT), descritos na seção 3.5.5.

3.5.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS *IN VIVO* DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38.

a) Modelo de Alça Intestinal Isolada de Camundongos

O protocolo seguiu o modelo descrito por Kirkwood *et al.* (2001) e adaptado para nossas condições (CAVALCANTE *et al*, 2006). Os camundongos C57BL/6, previamente colocados em jejum por 12h, foram anestesiados com ketamina (35 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) injetados por via intramuscular. Em seguida, realizou-se uma laparotomia mediana de 2-3cm, incidindo, em primeira instância, sobre a pele, seguido do peritônio, para a visualização do intestino delgado. Após exposição do ceco e identificação do jejuno, uma porção aproximadamente de 4-5 cm do jejuno foi lavada com PBS, em um volume de 1 mL, para remoção do excesso de fezes remanescente do jejum. Durante este procedimento, teve-se o cuidado de não traumatizar o intestino e preservar a vascularização entérica. Então a uma distância de cerca de 10 cm do ceco, uma alça de aproximadamente 4 cm de jejuno foi isolado

por meio de uma dupla ligadura obstrutiva, com linha de algodão estéril. Posteriormente, injetou-se na alça isolada 200 μL de salina estéril (Controle), DMSO 2% (veículo), SN38 nas doses de 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{alça}$, irinotecano 473 $\mu\text{g}/\text{alça}$ ou toxina da cólera 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo). Em seguida, as alças intestinais foram reposicionadas dentro da cavidade abdominal e suturou-se a incisão cirúrgica com fio de nylon 4-0.

Após 3 horas da injeção das drogas nas alças isoladas (KIRKWOORD *et al*, 2001; CAVALCANTE *et al*, 2006), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Realizou-se a reabertura da cavidade abdominal dos animais para coleta das alças. Mensurou-se o comprimento (cm), o peso (mg) e o volume do conteúdo intestinal (μL). O edema e a secreção foram calculados dividindo-se o peso da alça pelo seu comprimento (mg/cm), e pelo volume do conteúdo intestinal pelo comprimento da alça ($\mu\text{L}/\text{cm}$).

b) Histopatologia na Alça Isolada

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, foi removido um segmento de 0,5 cm da alça intestinal isolada (jejuno) do camundongo. A seguir, as amostras foram fixadas em formol tamponado 10% (6-24h) e processadas para coloração pelo método H&E (Hematoxilina-Eosina).

Realizou-se avaliação histológica onde foram atribuídos escores variando de **escore 0** (ausência de alteração), **escore 1** (alterações brandas), **escore 2** (alterações moderadas) e **escore 3** (alteração severa), de acordo com o dano epitelial, edema e infiltração de neutrófilo, conforme descrito por Cavalcante *et al*, (2006).

c) Determinação da atividade de Mieloperoxidase (MPO)

Após o experimento de alça isolada foram colhidos segmentos da alça do jejuno para posterior dosagem da atividade de MPO. As amostras foram incubadas em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de tecido por mL, e homogeneizada e centrifugada (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7 μL do sobrenadante (placas de 96 wells), 200 μL da solução de leitura (5

mg O-dianisidine; 15 μ L H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H₂O) foram adicionados e lidos a 450nm ($t_0=0$ min e $t_1=1$ min). Os valores foram expressos em termos de atividade de MPO (U/mg de tecido) (BRADLEY *et. al.*, 1982).

3.5.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38 NAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS *IN VITRO*

a) Cultura de Células

Foram utilizadas células epiteliais intestinais de rato (IEC-6), derivada da cripta do jejuno de ratos normais, adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Essa reconhecida linhagem de célula foi desenvolvida e caracterizada por Quaroni *et al.*, (1979), que caracterizaram as células IEC-6 por critérios morfológicos e imunológicos, como células não diferenciadas da cripta de intestino. Estudo Ultraestrutural revelou a presença de microvilosidade cobrindo a superfície da célula, proteínas de junção (*Tight junction*), um extenso complexo de Golgi, e a presença de material amorfo extracelular similar em aparência ao isolado na membrana basal (QUARONI *et al.*, 1979).

O meio de cultura para a manutenção da IEC-6 foi composto de DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo 4.5 g/mL de glicose e L-glutamina e acrescido de Soro Bovino Fetal 5% (SFB), insulina bovina 0,1 U/mL, piruvato de sódio com concentração final de 1mM e penicilina/estreptomicina 50 μ g/mL. Às células foram mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C e cultivadas em frascos de 75 cm². Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio invertido, o meio de cultura era trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes (3 vezes por semana).

b) Tripsinização e Contagem das Células

Antes da realização da contagem, às células aderidas (IEC-6) na placa de cultura confluenta foram liberadas da superfície em que se encontravam aderidas. Utilizou-se

Tripsina-EDTA, a tripsina age digerindo e clivando as proteínas de adesão; e o EDTA, por sua vez, quela os cátions divalentes livres (CURI & PERES, 2005).

Para iniciar o processo de tripsinização, verificou-se a confluência das células com o auxílio do Microscópio invertido, em seguida o frasco foi devolvido à incubadora até o momento do uso. É feito então o processo de limpeza do fluxo laminar ligando-se a luz ultravioleta durante 30 minutos, colocaram-se no fluxo todo o material a ser utilizado.

Adicionou-se 1 mL de Tripsina-EDTA ao frasco com as células a fim de desprendê-las durante 5 minutos na estufa. As células já tripsinizadas adicionaram-se 4 a 5 mL de meio com soro bovino fetal misturando suavemente a solução. As proteínas do soro são clivadas pela tripsina e competem com as moléculas de adesão das células, permanecendo-as viáveis. Após o recolhimento da solução (células, meio, tripsina-EDTA) para um tubo falcon de 15 mL foram centrifugadas a 1500 rpm por 8 min sob refrigeração a 4°C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante do tubo falcon, e em seguida adicionaram-se ao pellet 5 mL de meio com glutamina e resuspendido. Depois, retirou-se 100 µL da suspensão de células e colocados em tubo de 2 mL contendo 900 µL de meio DMEM, fazendo uma diluição de 1:10 para a realização da contagem de células.

A contagem de células foi realizada na câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico (100X), foram contados os quatro quadrantes e feita a média para obtenção do resultado. As células sobre as linhas inferiores e da direita ou superiores e da esquerda foram excluídas da contagem. A concentração total de células na suspensão original foi calculada da seguinte forma:

$$A = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição (10)}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrados contados}}$$

Sendo a seguinte fórmula utilizada para o plaqueamento das células:

$$A \times 10^5 \times V1 = C2 \times V2$$

A – concentração contada na câmara de Neubauer

V1 – volume a ser retirado das células

C – concentração de células desejada para o experimento

V2 – volume total para preenchimento das placas.

Após o preparo da nova solução, os poços foram plaqueados para os experimentos. Foi verificada ao microscópio invertido a quantidade de células adicionadas aos poços e em seguida levados a incubadora de CO₂.

c) **Teste de Citotoxicidade *In Vitro* – Ensaio do MTT**

O ensaio de MTT tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo, bastante útil para avaliar a citotoxicidade. O teste baseia-se na redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio (MTT) de cor amarela em cristais insolúveis de cor púrpura, formazan. Portanto, quanto maior a intensidade da coloração púrpura maior o número de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983).

As células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 96 poços numa densidade de 2×10^5 células/mL em meio de cultura DMEM completo, e incubadas na estufa de CO₂ até atingir de 50 a 80% de confluência. Posteriormente, foram incubadas o veículo (DMSO 0,4%), SN38 (0,04 a 4000 µM) e irinotecano (0,04 a 4000 µM) durante 3, 6, 12 e 24 horas juntamente com a suspensão de células. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/10min), e o sobrenadante foi aspirado e descartado. Foi adicionado 200 µL da solução de MTT 10 % na placa de 96 poços, e reincubada por 3 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período, as placas foram novamente centrifugadas (1500 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150 µL de DMSO concentrado. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as substâncias foram lidas no Leitor de placa, no comprimento de onda de 570 nm.

O SN38 e irinotecano foram testadas em diluição seriada. Foi registrado o gráfico de absorbância x concentração. Os valores de IC₅₀ (concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram determinados através de uma curva concentração-resposta sigmoidal não linear.

d) Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripan

O teste de exclusão por azul de tripan permitiu quantificar separadamente as células viáveis das células mortas. O corante azul de tripan penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira, observar uma coloração azulada nas células metabolicamente inativas.

As células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 24 poços numa densidade de 2×10^5 células/mL em meio de cultura DMEM completo, e incubadas na estufa de CO₂ até atingir de 50 a 80% de confluência. Posteriormente, foram incubadas o veículo (DMSO 0,4%), SN38 (4, 40 e 400 µM) e irinotecano (400 µM) durante 3, 6, 12 e 24 horas juntamente com a suspensão de células. Utilizou-se Doxorrubicina (0,5 µM) como controle positivo. Após o período de incubação, coletaram-se alíquotas de 50 µL da suspensão de células as quais foram adicionadas 50 µL do azul de tripan (0,04%) e incubadas por 10 min a temperatura ambiente. As células viáveis e não viáveis foram diferenciadas e contadas nos 4 quadrantes da câmara de Neubauer (100x). Foi calculada a concentração de células e percentagem de células viáveis seguindo as formulas descrita abaixo:

$$\text{Concentração de células} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{N}^\circ \text{ de quadrantes}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células viáveis}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$

e) Análise Morfológica

A análise morfológica foi realizada pela coloração das células com Hematoxilina-Eosina (H&E). A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade por ácidos e pelas proteínas nucleares, conferindo ao núcleo uma coloração azul e a eosina por sua vez, é um corante basofílico e liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea. Realizou-se no microscópio óptico (aumento de 100x) a contagem do número de células por cada 10 campos. Adicionalmente, realizou-se a contagem da percentagem de células picnóticas, indicativo de morte celular nas IEC-6 incubadas com o SN38.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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 $P < 0,05$.

No teste de MTT, os valores de IC_{50} (concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram determinados através de uma curva concentração-resposta sigmoidal não linear

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

Resultados

4 RESULTADOS

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

Inicialmente, induziu-se a mucosite intestinal através da administração de irinotecano na dose de 75 mg/kg durante 4 dias. Ao longo do período de indução da mucosite, realizou-se a análise da curva ponderal. No quinto ou sétimo dia após a primeira dose de irinotecano, analisou-se a diarreia e a contagem sanguínea de leucócitos, os animais foram sacrificados para análise dos parâmetros gerais de mucosite, incluindo análise histopatológica e morfométrica intestinal (duodeno, jejuno, íleo e cólon) e dosagem de mieloperoxidase.

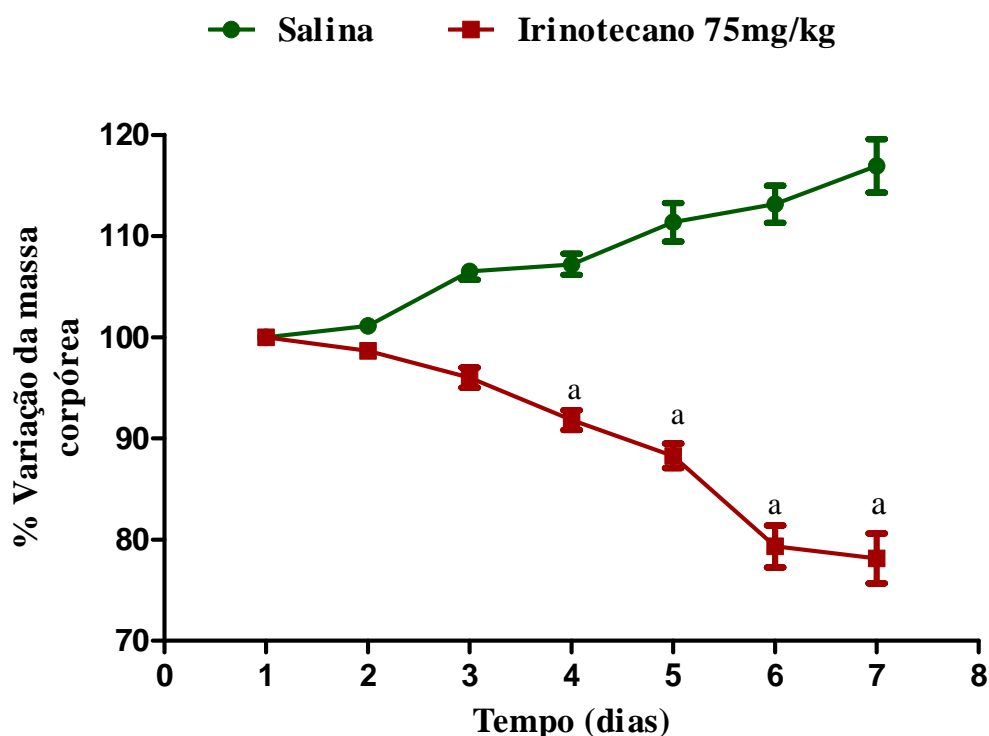
A **Figura 13** ilustra que o irinotecano promoveu uma significativa ($P < 0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente quando comparado ao grupo controle injetado apenas com salina. Adicionalmente, verificou-se (**Figura 14**) que o irinotecano induziu significativa diarreia ($P < 0,05$) de grau moderado a grave no quinto e sétimo dia experimental (1,5[0-2] e 2,5[1-3], respectivamente) quando comparado ao grupo salina (0[0-0]). Na **Figura 15** observa-se que o irinotecano induziu uma significativa ($P < 0,05$) leucopenia no quinto (43,5%) e no sétimo dia (66,2%) quando comparado ao grupo salina.

Após o sacrifício, as amostras de intestino foram utilizadas para análise morfométrica. Observa-se que no quinto e no sétimo dia experimental o irinotecano promoveu uma marcante redução ($P < 0,05$) da razão vilos/cripta (**Figura 16A**) e da área do vilos (**Figura 16B**) em todos os segmentos intestinais avaliados quando comparado ao grupo salina. As referidas alterações estão evidenciadas nas fotomicrografias do duodeno (**Figura 17**), jejuno (**Figura 18**) e íleo (**Figura 19**) em que se verificaram uma destruição da arquitetura dos vilos e criptas, presença de células polimorfonucleares e necrose de células da cripta versus o grupo salina. Tais observações são corroboradas pela análise das lesões histopatológicas, a qual está representada na **Tabela 1**. Conforme apresentado na **Figura 20**, a arquitetura do cólon também foi afetada pela administração do irinotecano, verificando-se uma destruição das criptas de Lieberkün e infiltração de neutrófilos, analisado, adicionalmente, por meio de escores histopatológicos (**Figura 21**).

A **Figura 22** demonstra que a administração de irinotecano induz um aumento significativo ($P<0,05$) do infiltrado de neutrófilos no jejuno (5º dia: 3782 ± 776 ; 7º dia: 2409 ± 485), íleo (5º dia: 5246 ± 289 ; 7º dia: 4267 ± 608) e pulmão (7º dia: 812 ± 26) versus o grupo salina (jejuno: 313 ± 105 ; íleo: 246 ± 70 e pulmão: 113 ± 43). No entanto, o irinotecano não induz aumento ($P>0,05$) da atividade de MPO em amostras de cólon em camundongos C57BL/6, quando comparado ao grupo salina (**Figura 22D**).

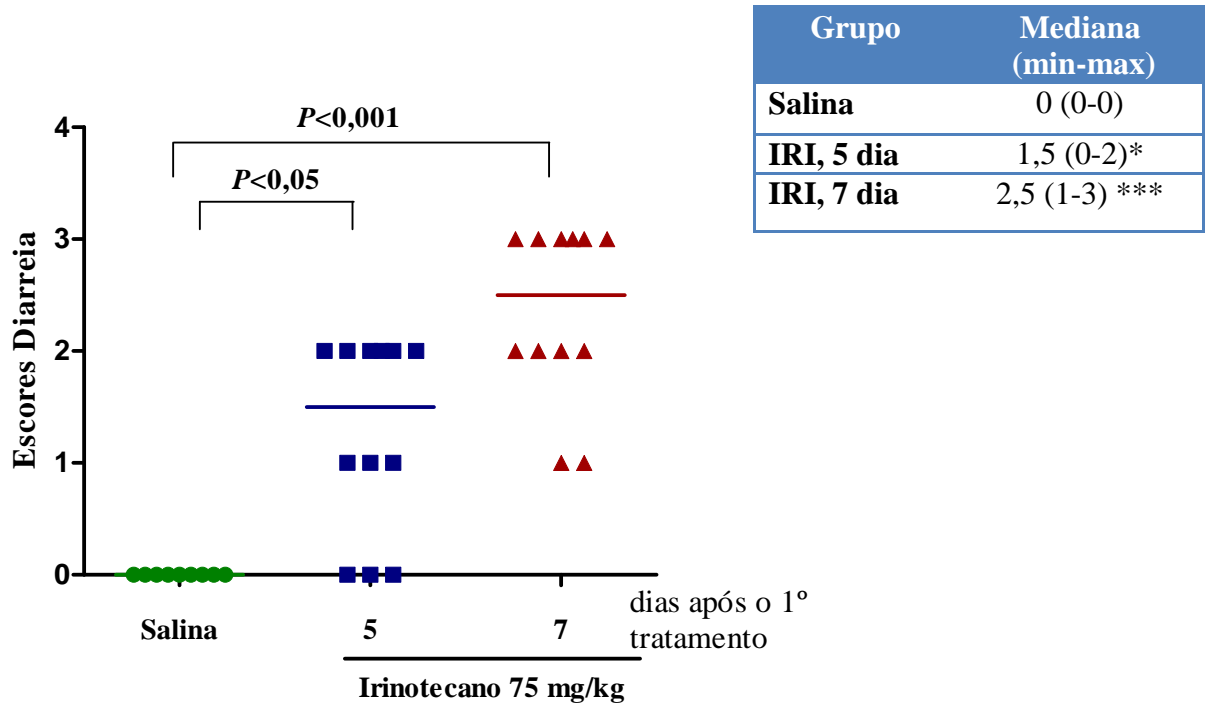
A **Tabela 2** mostra a injeção do irinotecano induz uma diminuição significativa ($P<0,05$) da temperatura retal no 5 e no 7 dia após a primeira administração do antineoplásico, quando comparado com o grupo injetado com salina.

FIGURA 13- Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de massa corpórea em função do tempo



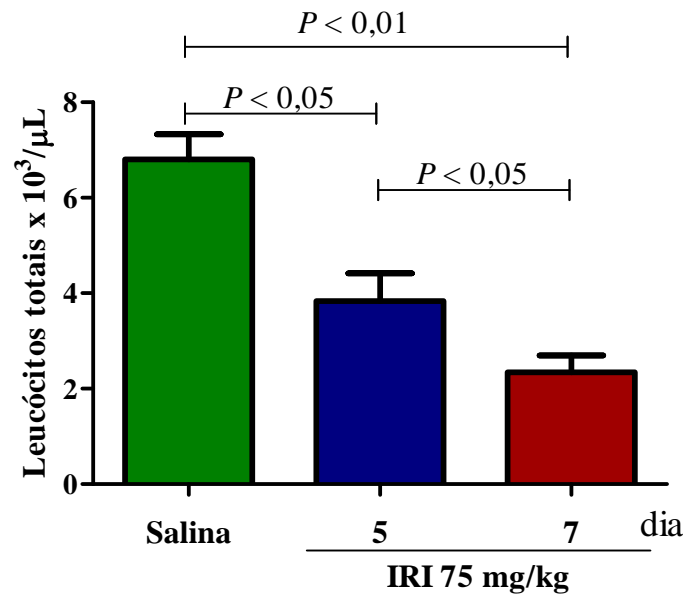
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e pesados diariamente até o sétimo dia experimental. O estudo revela que animais injetados com irinotecano na dose de 75 mg/kg apresentam perda ponderal quando comparado aos animais que receberam apenas salina.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

FIGURA 14 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos C57BL/6



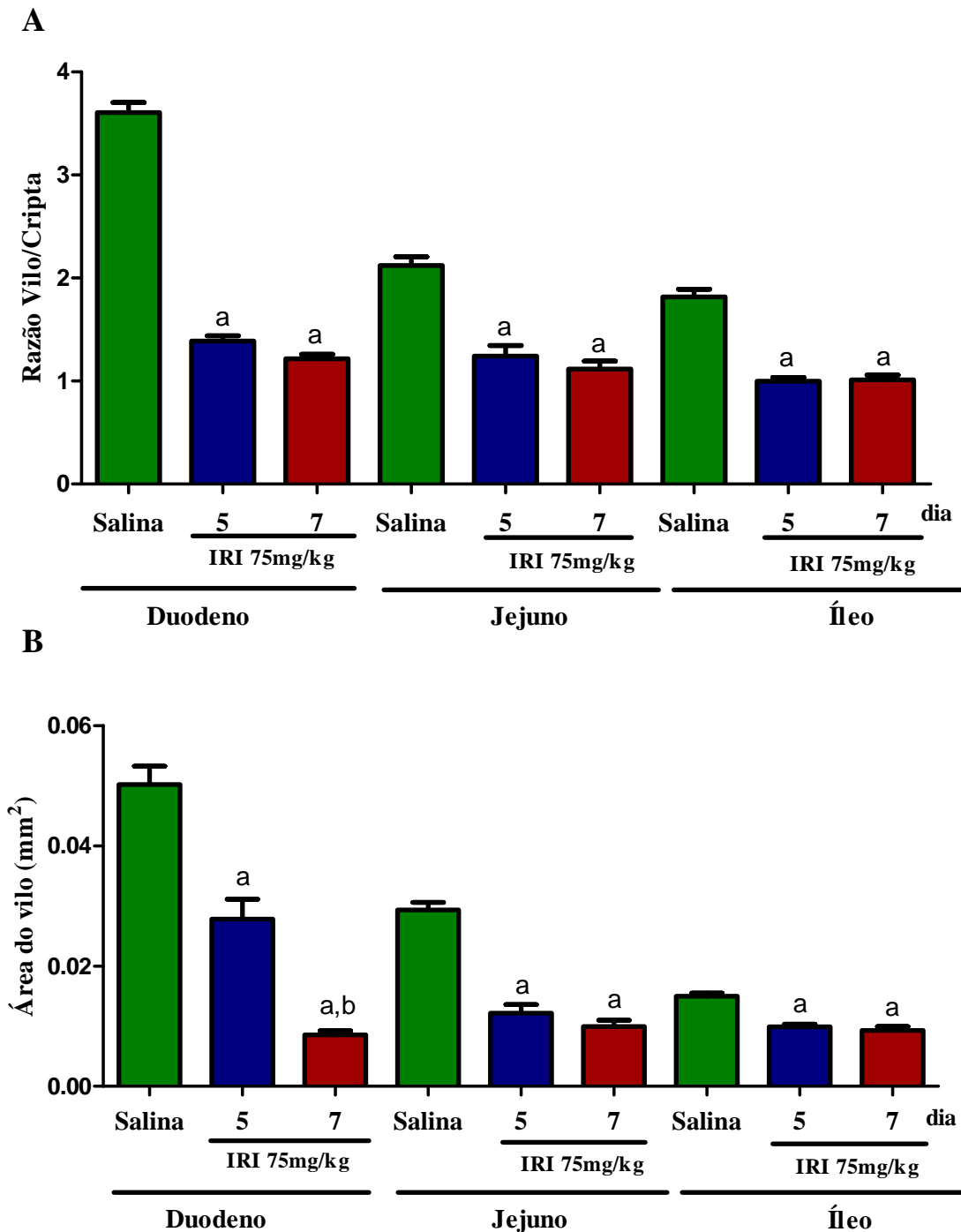
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e avaliados a diarreia no quinto e sétimo dia experimental. A diarreia foi avaliada através de escores propostos por Kurita *et al*, (2000). O gráfico mostra que animais injetados com irinotecano apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais injetados com salina. Os valores representam à mediana e variação dos escores de diarreia. * $P<0,05$; *** $P<0,001$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 15 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos C57BL/6



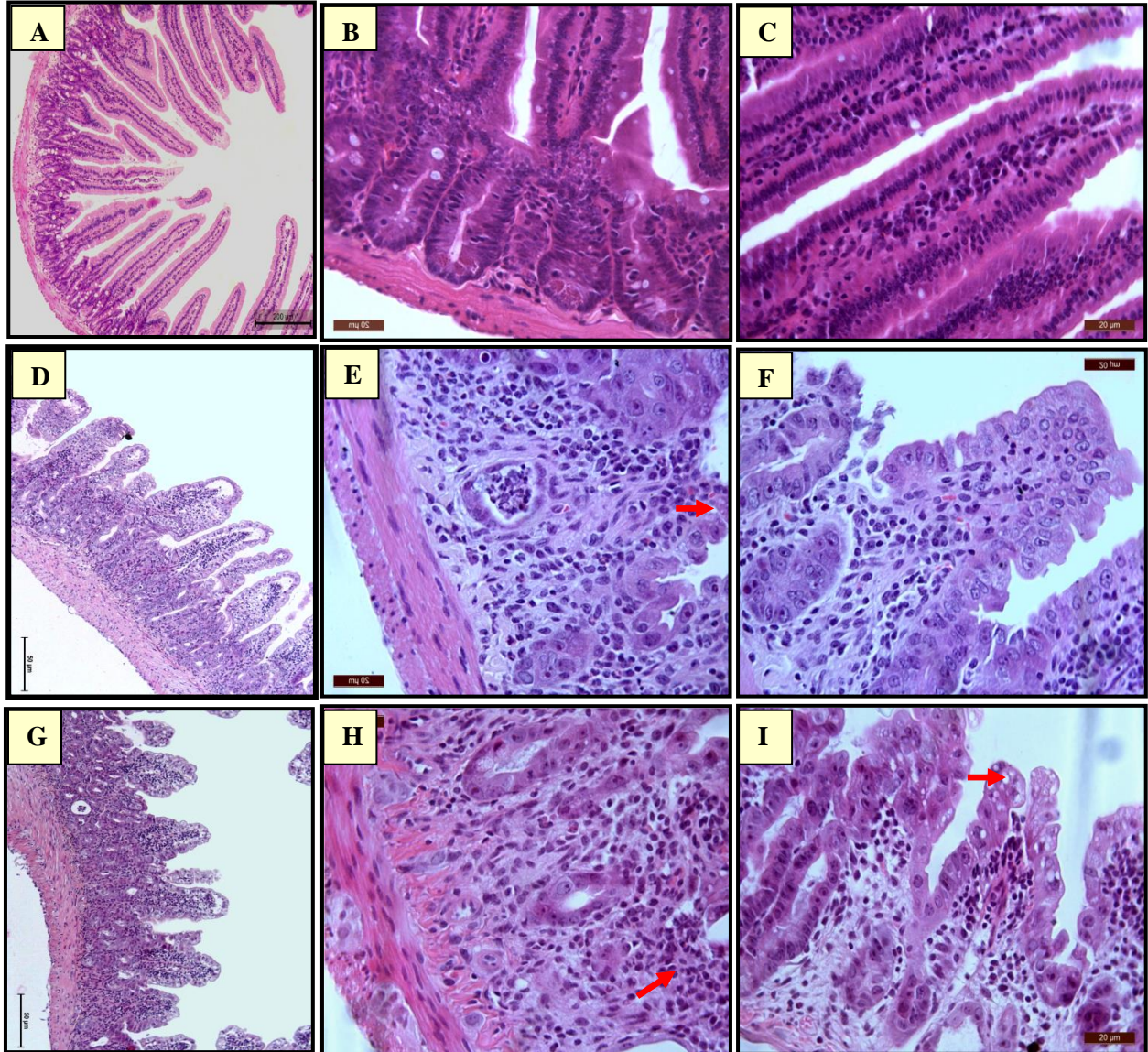
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital, e em seguida foi realizada a contagem do número total de Leucócitos no contador Automático de células - Colter. A figura apresenta o efeito do irinotecano em diminuir o número total de leucócitos circulantes, verificou-se a leucopenia no 5 e 7 dia após a primeira aplicação do antineoplásico. Os valores representam a média ± EPM do número de Leucocitos totais por 10³/µL. $P < 0,05$ vs animal tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 16 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica em segmentos intestinais



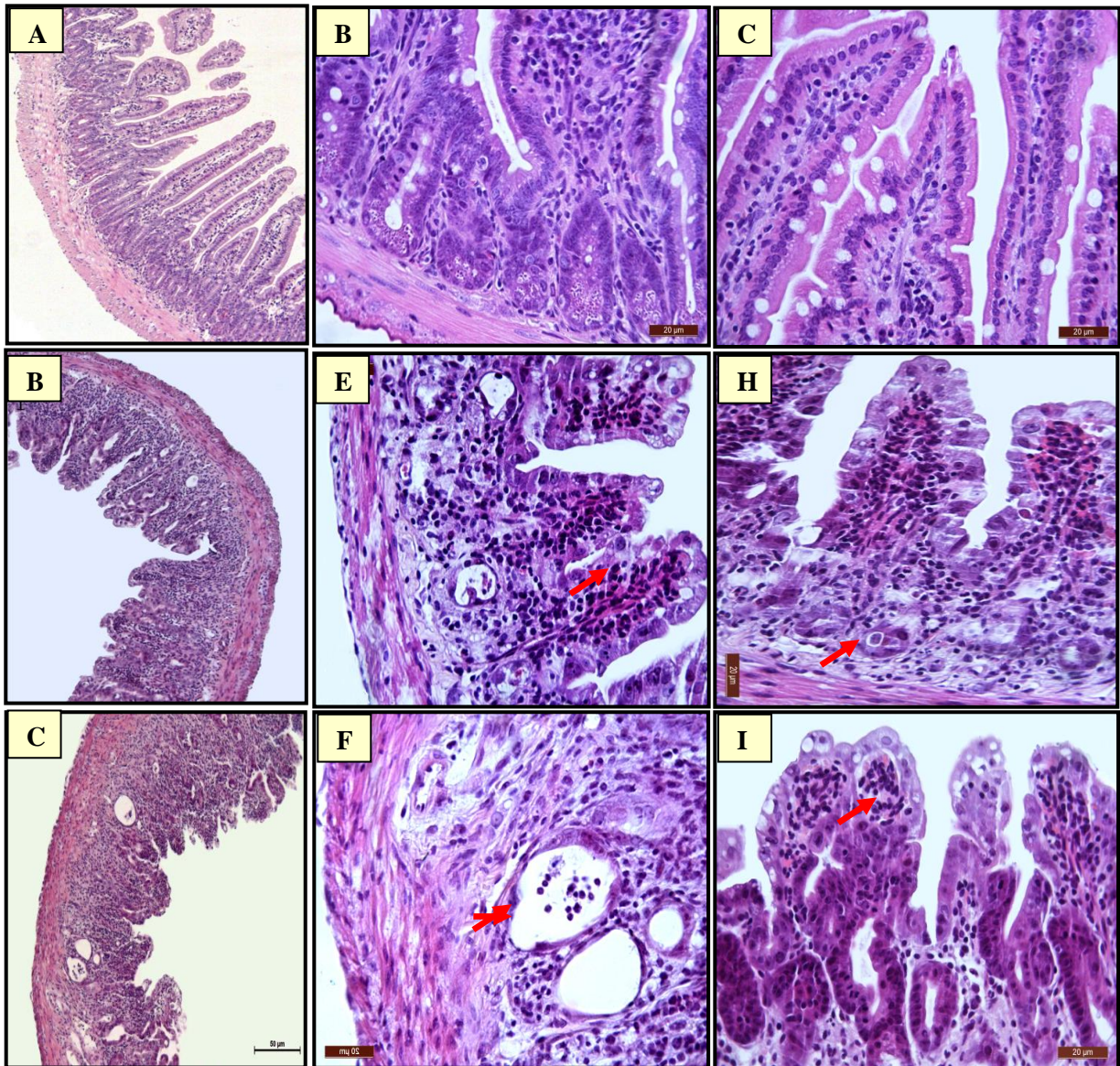
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E (400x) para posterior análise morfométrica. O Gráfico revela que o IRI induz redução da razão vilo/cripta (**Painel A**) e área do vilão (**Painel B**) quando comparada com camundongos injetados apenas com salina. Os valores representam a média \pm EPM. ^a $P < 0,001$; vs grupo salina; ^b $P < 0,001$ vs IRI 5dia. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 17 – Fotomicrografias de amostras de duodeno após a injeção do irinotecano camundongos C57BL/6



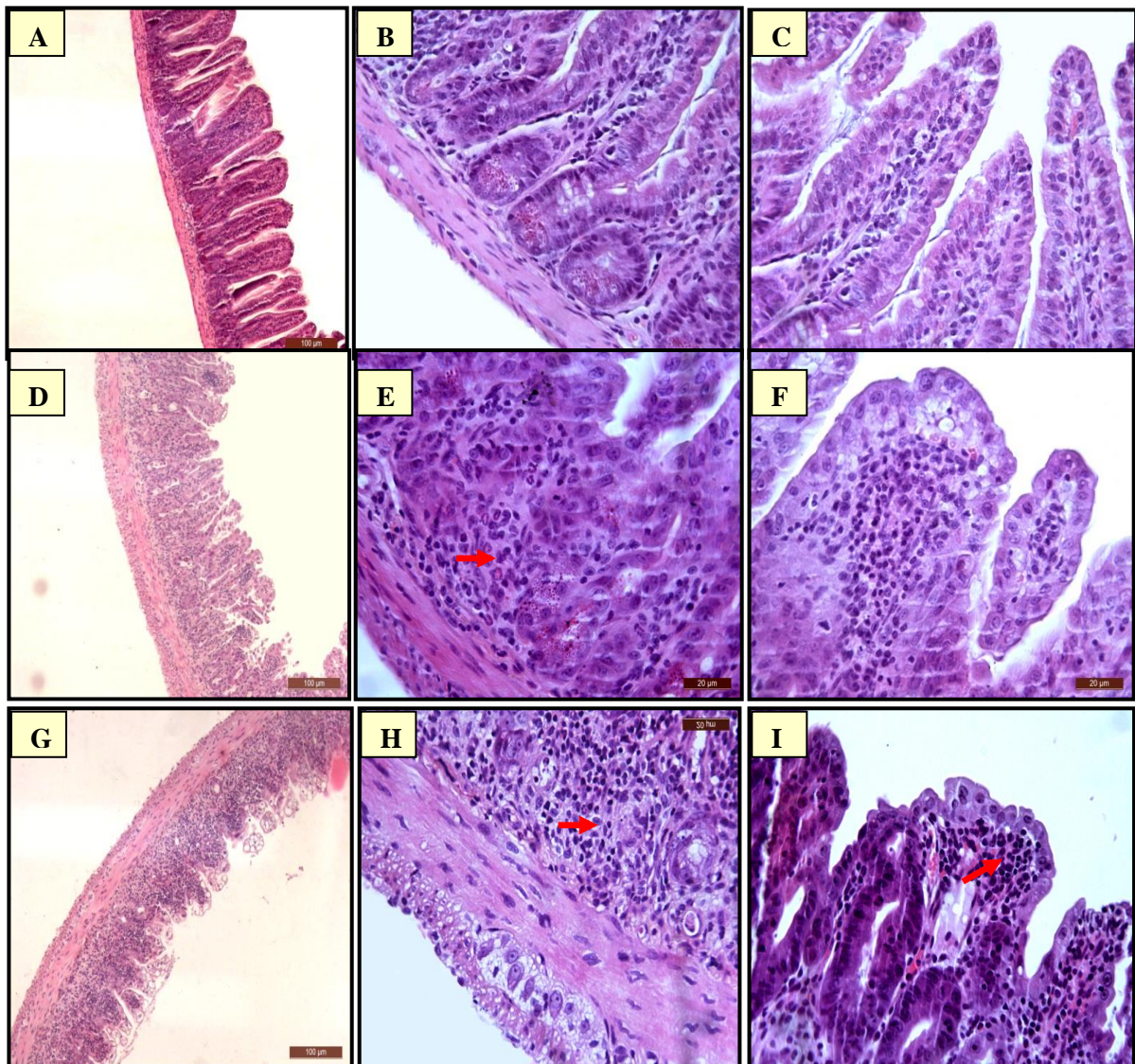
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Segmento de duodeno foi removido e corado pelo método de H&E para posterior análise histopatológica. A figura mostra as fotomicrografias de duodeno de camundongos C57BL/6 injetados com irinotecano ou com salina. Na mucosa dos animais que receberam IRI (75 mg/kg), os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, infiltração de neutrófilos. **Painel A:** Salina, 100x; **Painel B-C:** salina, 400x (cripta-vilo, respectivamente). **Painel D:** IRI 5dia, 100x; **Painel E-F:** IRI 5dia, 400x (cripta-vilo, respectivamente). **Painel G:** IRI 7dia, 100x; **Painel H-I:** IRI 7dia, 400x (cripta-vilo, respectivamente).

FIGURA 18 – Fotomicrografias de amostras de jejuno após a injeção do irinotecano em camundongos C57BL/6



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Segmento de jejuno foi removido e corado pelo método de H&E para posterior análise histopatológica. A figura mostra as fotomicrografias de jejuno de camundongos C57BL/6 injetados com irinotecano ou com salina. Na mucosa dos animais que receberam IRI (75 mg/kg), os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, infiltração de neutrófilos. **Painel A:** Salina, 100x; **Painel B-C:** salina, 400x (cripta-vilosidade, respectivamente). **Painel D:** IRI 5dia, 100x; **Painel E-F:** IRI 5dia, 400x (cripta-vilosidade, respectivamente). **Painel G:** IRI 7dia, 100x; **Painel H-I:** IRI 7dia, 400x (cripta-vilo, respectivamente).

FIGURA 19 – Fotomicrografias de amostras de íleo após a injeção do irinotecano em camundongos C57BL/6



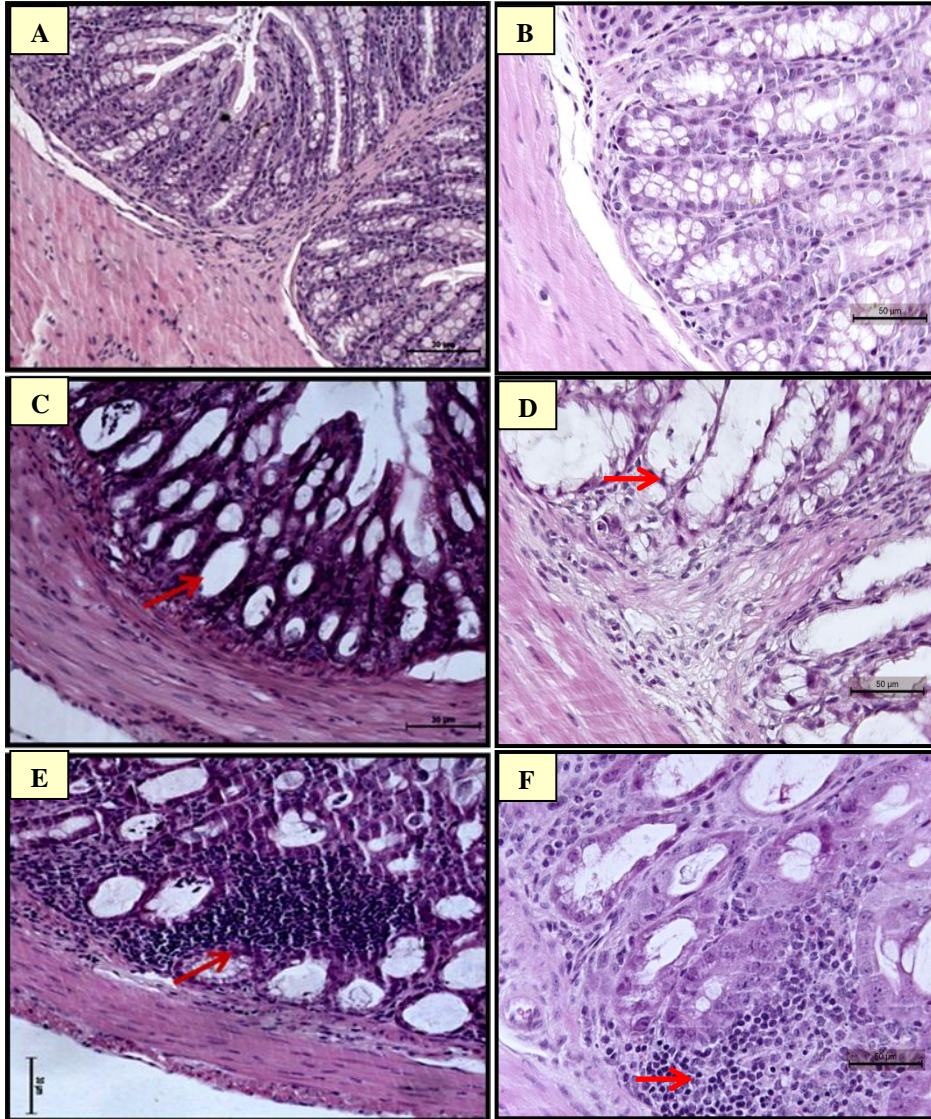
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Segmento de íleo foi removido e corado pelo método de H&E para posterior análise histopatológica. A figura mostra as fotomicrografias de íleo de camundongos C57BL/6 injetados com irinotecano ou com salina. Na mucosa dos animais que receberam IRI (75 mg/kg), os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, infiltração de neutrófilos. **Painel A:** Salina, 100x; **Painel B-C:** salina, 400x (cripta-vilo, respectivamente). **Painel D:** IRI 5dia, 100x; **Painel E-F:** IRI 5dia, 400x (cripta-vilo, respectivamente). **Painel G:** IRI 7dia, 100x; **Painel H-I:** IRI 7dia, 400x (cripta-vilo, respectivamente).

TABELA 1 – Mediana dos escores histopatológicos de segmentos intestinais após a indução da mucosite induzida pelo irinotecano

Grupo	Escores histopatológicos		
	Mediana (Min-Max)		
	Duodeno	Jejuno	Íleo
Salina	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
IRI-5dia	3 (1-4) ^a	3 (1-4) ^a	3.5 (3-4) ^a
IRI-7dia	3.5 (2-4) ^a	3 (2-4) ^a	3 (2-4) ^a

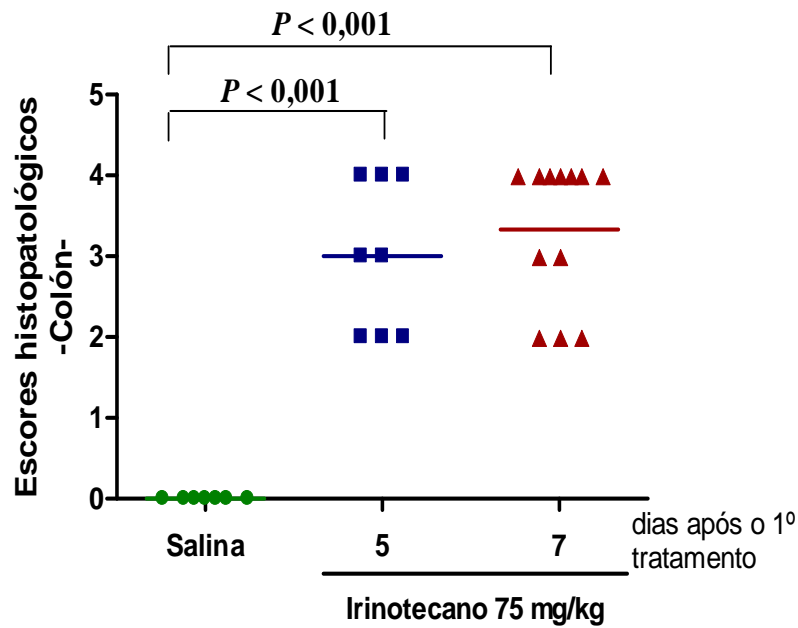
A tabela mostra que o IRI 75 mg/kg, induziu aumento dos escores histopatológicos em duodeno, jejuno e íleo quando comparados com os camundongos injetados apenas com salina. Os dados mostram a mediana (mínimo e máximo) dos escores histopatológicos. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 20 – Fotomicrografias de amostras de cólon após a injeção do irinotecano em camundongos C57BL/6



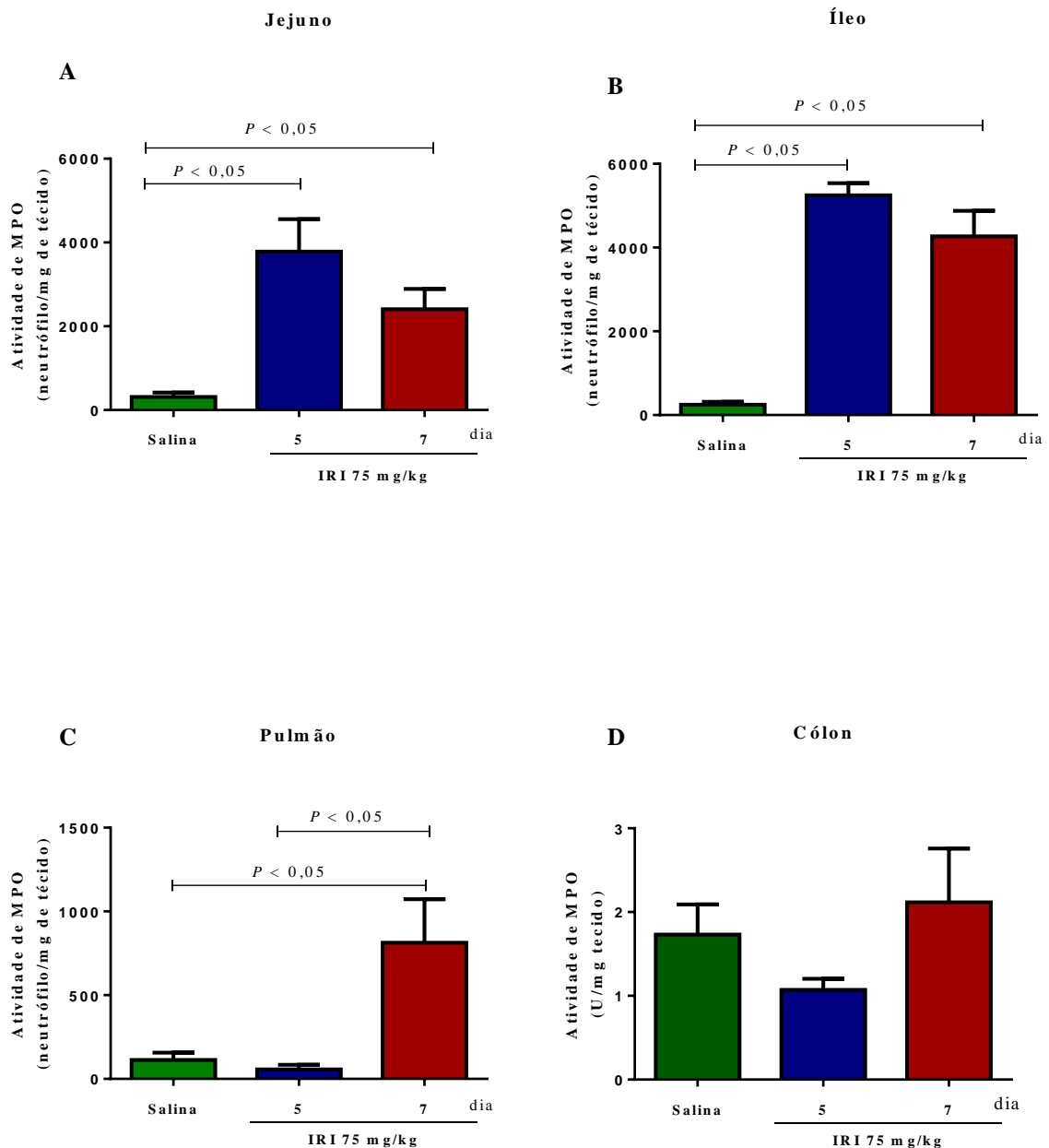
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. O cólon foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise histopatológica. A figura mostra as fotomicrografias de cólon de camundongos C57BL/6 injetados com irinotecano ou com salina. Na mucosa dos animais que receberam IRI (75 mg/kg) apresentaram vacuolização das criptas de Lieberkühn, infiltração de neutrófilos. Salina 100x (**Painel A**) e 400x (**Painel B**); IRI 5dia, 100x (**Painel C**) e 400x (**Painel D**); IRI 7dia, 100X (**Painel E**) e 400x (**Painel F**).

FIGURA 21 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores histopatológicos do cólon em camundongos C57BL/6



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. O cólon foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x) para posterior análise histopatológica. O gráfico mostra que animais injetados com irinotecano apresentaram um aumento na mediana dos escores histopatológico de cólon quando comparado aos animais injetados apenas com salina. $P < 0,001$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 22 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais e pulmão de camundongos C57BL/6



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) e sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Amostras de jejuno (**Painel A**), íleo (**Painel B**), pulmão (**Painel C**) e colón (**Painel D**) foram coletados para a determinação do infiltrado neutrófilico através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO). O gráfico mostra que animais injetados com irinotecano apresentaram aumento da atividade de MPO nos segmentos intestinais e pulmão quando comparado com o grupo salina. Os valores representam a média \pm EPM do número de neutrófilos por mg de tecido. $P < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

TABELA 2 – Mensuração da temperatura retal (°C) em camundongos 5 e 7 dias após a injeção com irinotecano

Grupo	Temperatura retal (°C)
	Média ± EPM
Salina (n=11)	36,95 ± 0,19
IRI 5 dia (n=7)	35,16 ± 0,13 ^a
IRI 7 dia (n=7)	34,93 ± 0,3 ^a

A tabela revela que animais (C57BL/6) apresentaram uma diminuição da temperatura retal (°C) no 5 e 7 dias após a injeção com irinotecano na dose de 75 mg/kg, quando comparado aos animais injetados apenas com salina. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FUNCIONAIS DA BARREIRA INTESTINAL APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO

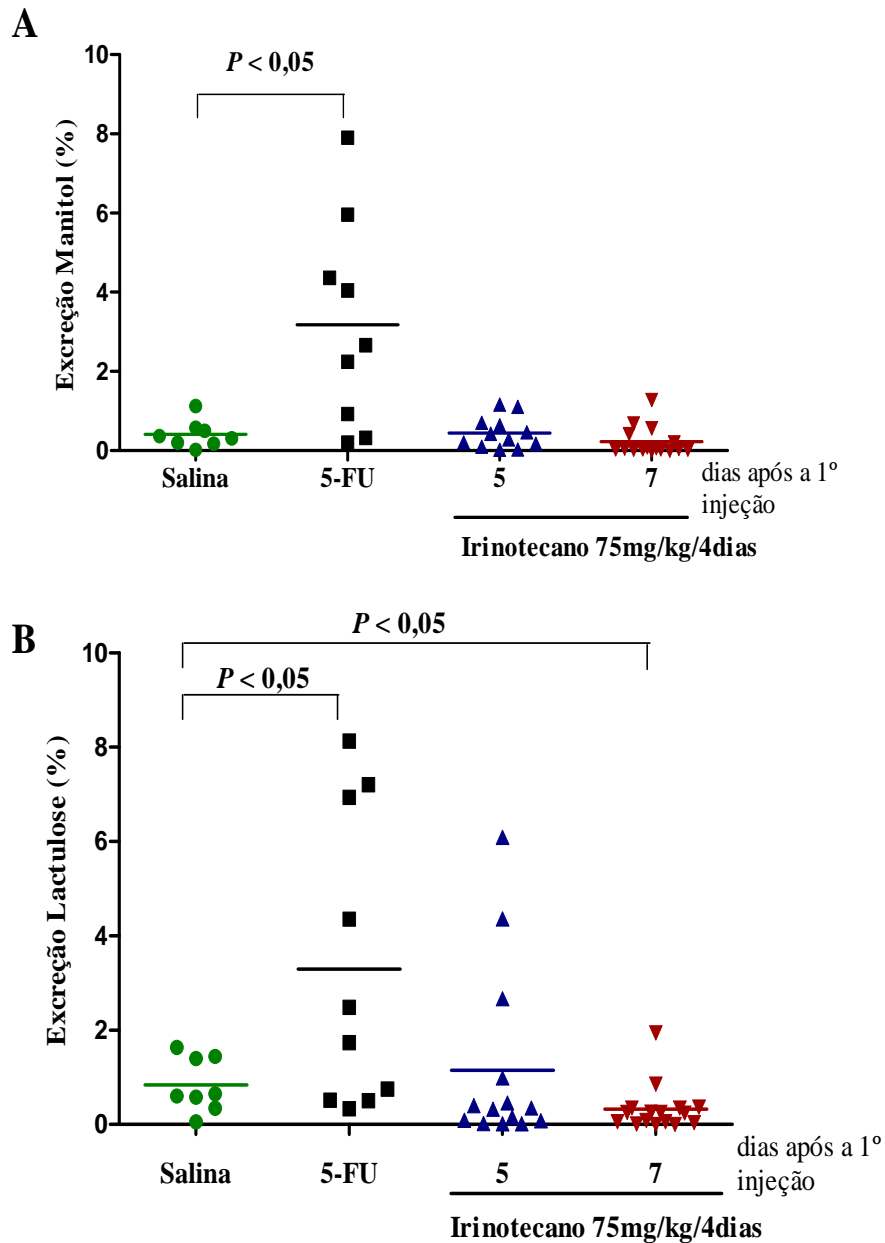
Após a indução da Mucosite induzida pelo irinotecano, realizou-se a avaliação funcional da barreira intestinal através do teste de permeabilidade e perfusão intestinais para avaliar o transporte de íons, assim como a função renal para correlacionar com os dados de excreção urinária de açúcares.

A **Figura 23B** ilustra que o irinotecano diminuiu significativamente ($P<0,05$) a excreção urinária de Lactulose ($0,3221 \pm 0,12$) no sétimo dia experimental, quando comparado ao grupo salina ($0,837 \pm 0,2$). Neste teste, utilizou-se como controle positivo o antineoplásico 5-FU, evidenciando o aumento da excreção de Lactulose ($3,293 \pm 0,98$) em camundongos C57BL/6. Por outro lado, o irinotecano não foi capaz de alterar a excreção urinária de Manitol versus o grupo salina (**Figura 23A**). Adicionalmente, o irinotecano evidenciou uma significativa diminuição ($P<0,05$) da razão Lactulose/Manitol no quinto dia experimental, como mostra a **Figura 24**.

Na avaliação da perfusão intestinal, observou-se que o irinotecano promoveu o aumento ($P<0,05$) da secreção intestinal de Sódio (5dia: $-12,60 \pm 1,5$; 7dia: $-8,4 \pm 1,2$), potássio (5dia: $-1,28 \pm 0,09$; 7dia: $-1,24 \pm 0,1$) e cloreto (5dia: $-12,18 \pm 1,37$) quando comparado ao grupo salina (Na^+ : $21,19 \pm 13,6$; K^+ : $-0,8 \pm 0,1$; Cl^- : $-4,65 \pm 1,6$) (**Figura 25**). Adicionalmente, empregou-se a Toxina da Cólera ($1\mu\text{g/mL}$) como controle positivo da secreção intestinal de íons (Na^+ : $-12,96 \pm 1,4$; K^+ : $-2,1 \pm 0,2$; Cl^- : $-14,39 \pm 1,4$).

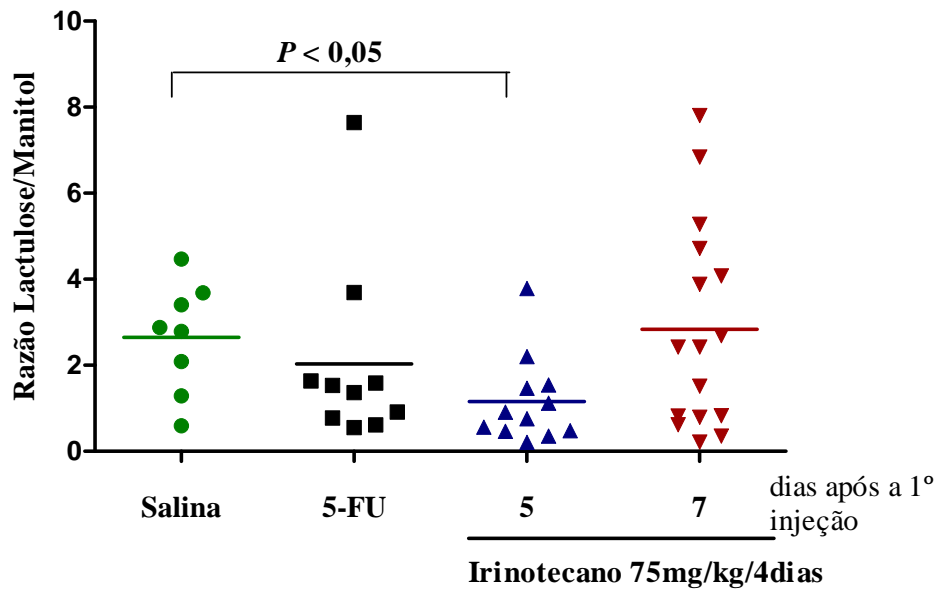
Os resultados mostram que o irinotecano não altera ($P>0,05$) a dosagem sérica de Creatinina (5dia: $0,39 \pm 0,04$; 7dia: $0,51 \pm 0,03$) e Ureia (5dia: $55,23 \pm 3,45$; 7dia: $53,63 \pm 11,8$), quando comparado ao grupo salina (Creatinina: $0,40 \pm 0,04$; ureia: $64,43 \pm 2,2$) (**Figura 26A e Figura 26B**, respectivamente)

FIGURA 23 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a excreção urinária de lactulose e manitol em camundongos C57BL/6



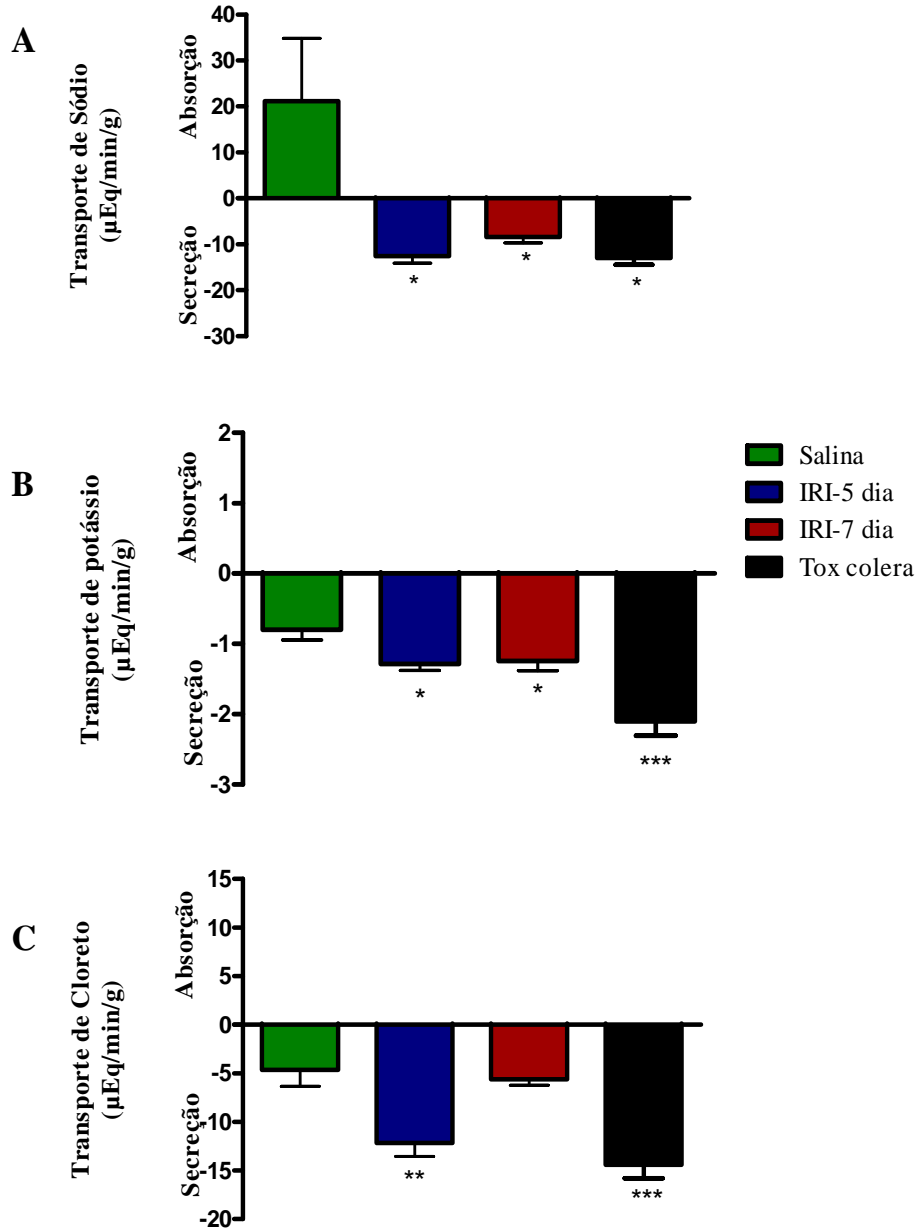
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. A urina foi coletada após a gavagem de 0,25 mL solução de Lactulose/Manitol, e uma alíquota de 50 μ L de urina foi utilizada para determinar a excreção dos açúcares por HPLC. Utilizou-se 5-fluorouracil (5-FU) como controle positivo. **Painel A:** Excreção urinária de manitol. **Painel B:** Excreção urinária de lactulose. Os valores são apresentados como média e variação do % de excreção dos açúcares. $P < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 24 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a razão lactulose/manitol em camundongos C57BL/6



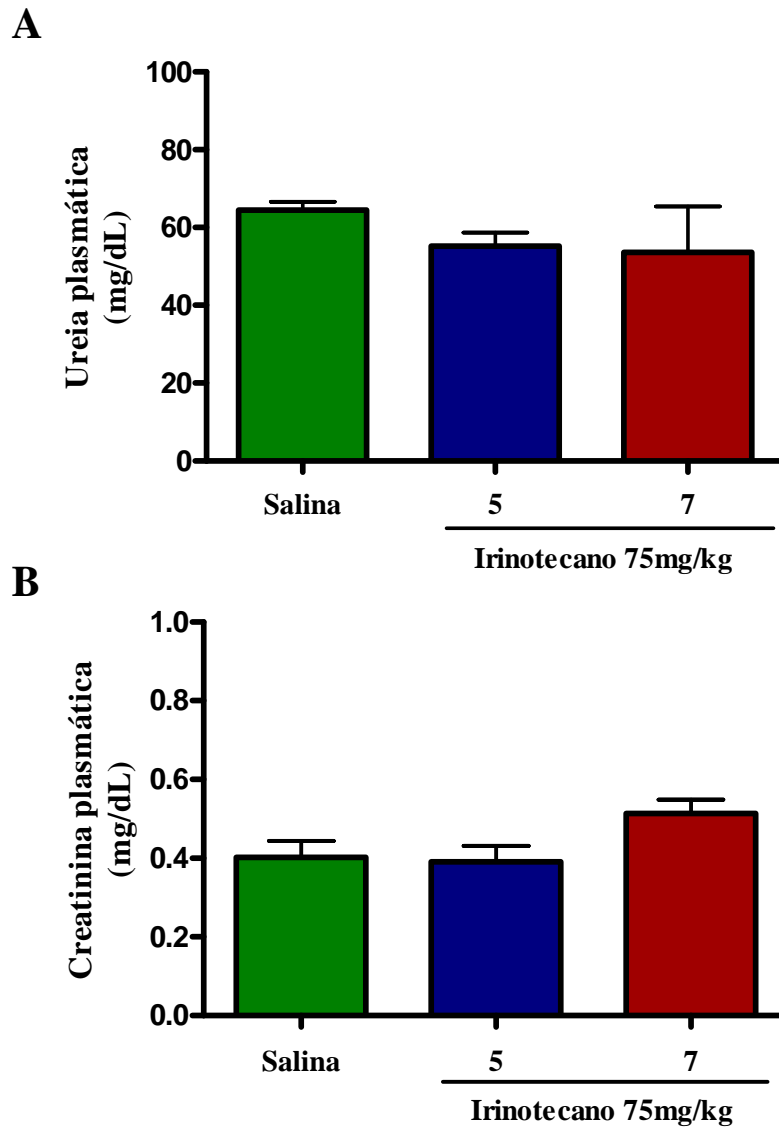
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. A urina foi coletada após a gavagem de 0,25 mL solução de Lactulose/Manitol, e uma alíquota de 50 μ L de urina foi utilizada para determinar a excreção dos açúcares por HPLC. Utilizou-se 5-fluorouracil (5-FU) como controle positivo. Os valores são apresentados média e variação. $P < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 25 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a secreção intestinal de sódio, potássio e cloreto em camundongos submetidos à perfusão intestinal



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. O gráfico mostra o transporte intestinal de sódio (Painel A), potássio (Painel B) e cloreto (Painel C) em camundongos C57BL/6 injetados com irinotecano 75mg/kg ou salina submetida à perfusão intestinal (60 min) com solução perfusora de ringer modificada a 37°C. Utilizou-se como controle positivo a toxina da cólera (1μg/mL). Os valores são apresentados como média e E.P.M do transporte intestinal de íons. IRI: irinotecano, TOX: toxina da cólera. * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 26 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a concentração plasmática de ureia e creatinina



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. O sangue foi coletado pelo plexo retroorbital e obtida o plasma para a dosagem colorimétrica de ureia (**Painel A**) e creatinina (**Painel B**). Os valores são apresentados como média e EPM das concentrações séricas de ureia e creatinina. $P < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.3 AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA, TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E EXPRESSÃO DE RECEPTORES TOLL LIKE 4 APÓS A INDUÇÃO DA MUCOSITE POR IRINOTECANO

A **Tabela 3** apresenta o crescimento qualitativo de bactérias circulantes após a indução da mucosite por irinotecano. Houve um aumento da bacteremia nos animais injetados com irinotecano no quinto (25%) e sétimo (42,85%) dia experimental, em relação ao grupo salina. A **Figura 27** mostra o aumento significativo ($P < 0,05$) do crescimento quantitativo de bactérias circulantes após a indução da mucosite por Irinotecano quando comparado ao grupo salina.

Na avaliação da translocação bacteriana, o irinotecano evidenciou um aumento significativo ($P < 0,05$) do crescimento de bactérias no linfonodo mesentérico (**Figura 28A**) e fígado (**Figura 28B**) quando comparado com o grupo salina. A identificação bioquímica de bacilos gram negativos que translocaram evidenciou a presença de *Escherichia coli*, *Citrobacter sp.*, bactérias gram-negativas não-fermentadoras e *Pseudomona aeruginosa* nos camundongos C57BL/6 injetados com Irinotecano (**Tabela 4**).

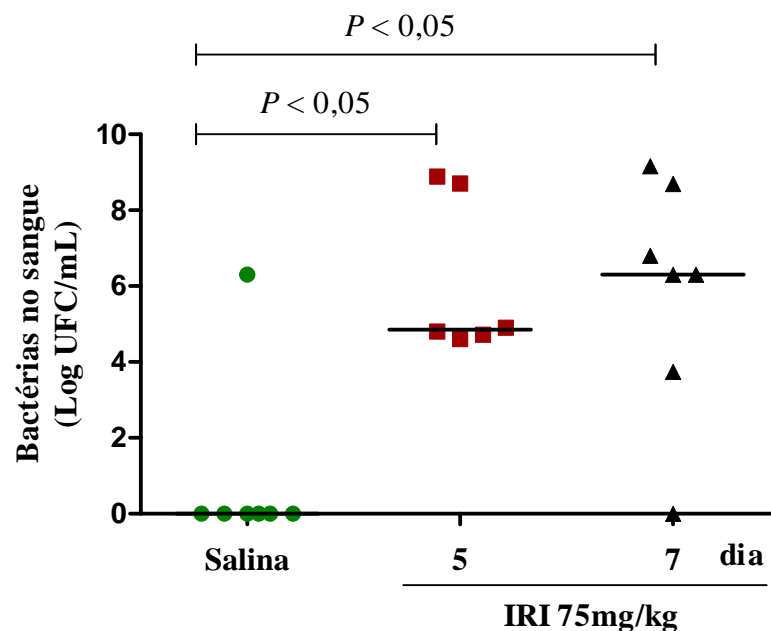
Na análise de imunohistoquímica para TLR4, nas fotomicrografias (**Figura 29**) e nos escores de imunomarcção (**Figura 30**), observaram-se um significativo aumento ($P < 0,05$) da imunomarcção para TLR4 no intestino de animais injetados com Irinotecano quando comparados ao grupo salina.

TABELA 3 - Percentagem de bacteremia em camundongos C57BL/6 injetados com Irinotecano 75mg/kg

Grupo	Bacteremia	Percentagem
Salina	0/8	0%
Irinotecano, 5 dia	2/8	25%
Irinotecano, 7 dia	3/7	42,85%

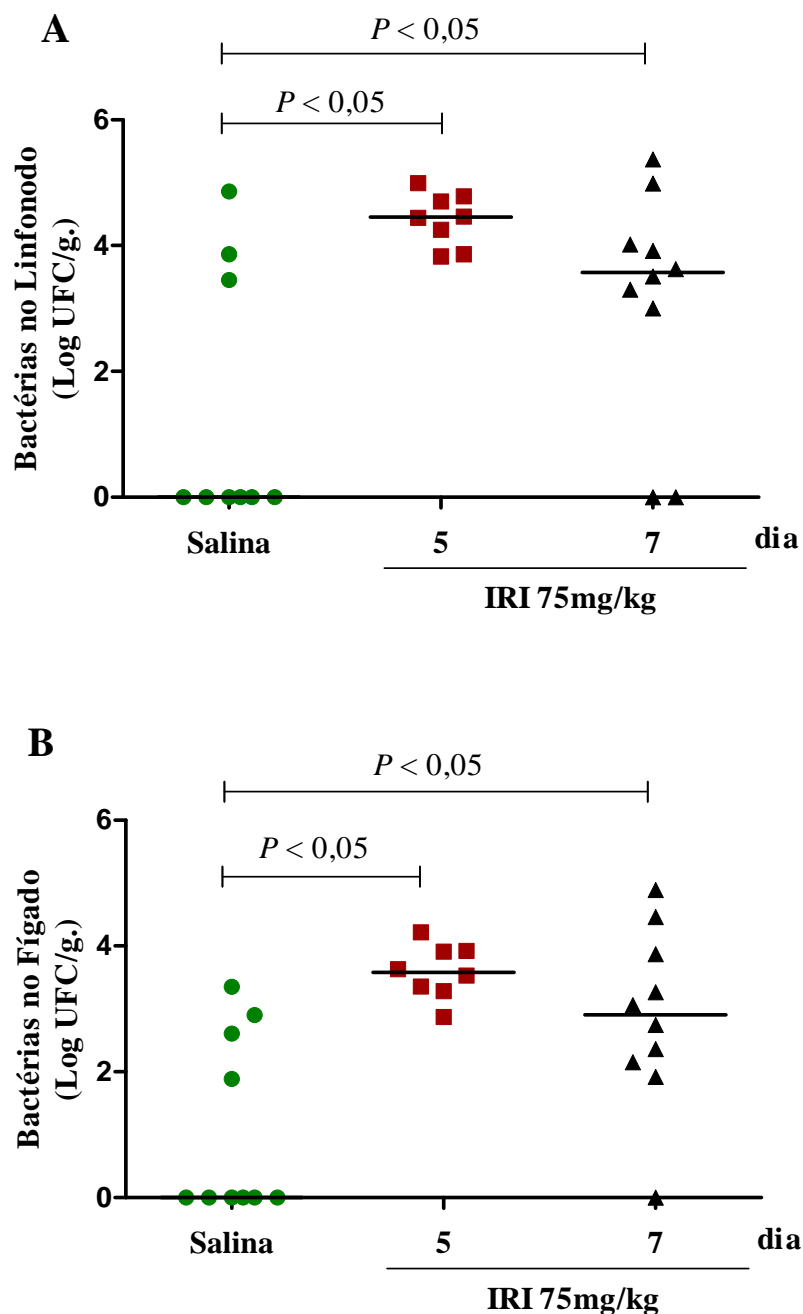
Camundongos injetados com IRI apresentaram crescimento bacteriano em amostras de sangue do plexo retro-orbital semeados em caldo BHI. Os dados representam a percentagem de bacteremia.

FIGURA 27 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue



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

FIGURA 28 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no linfonodo mesentérico e fígado



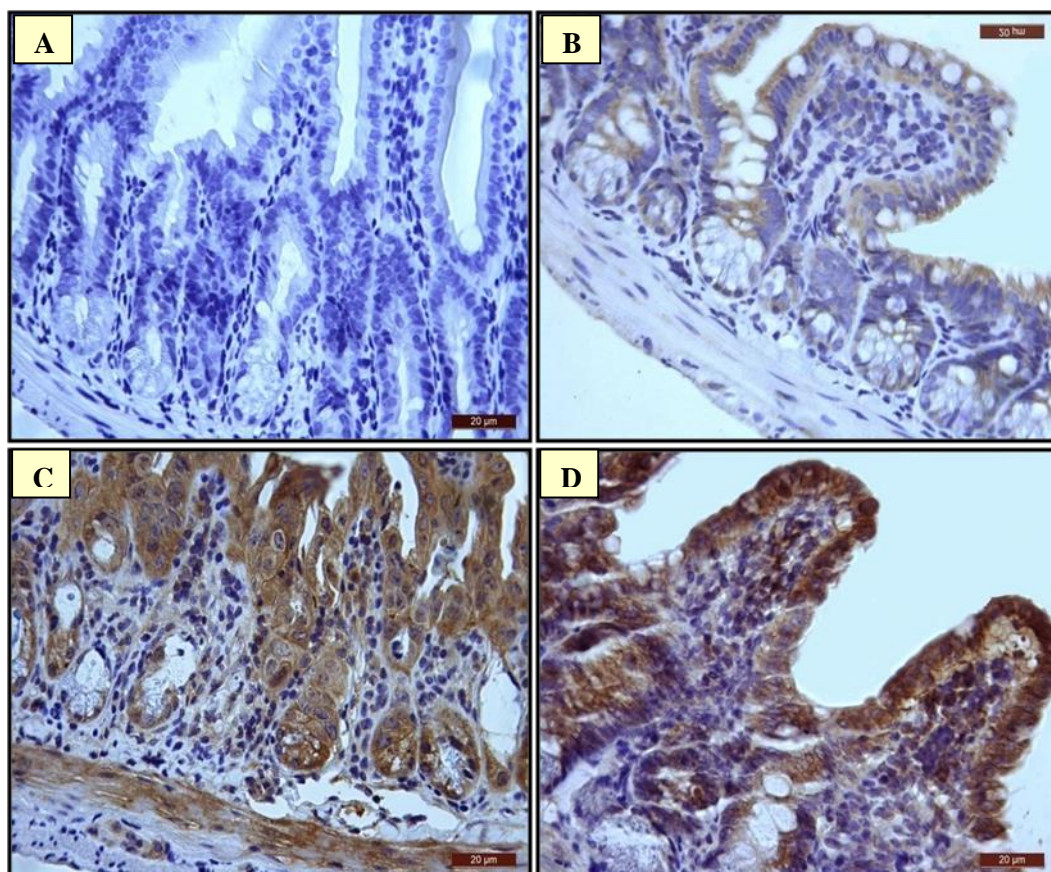
Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Após o sacrifício, realizou-se o ensaio de translocação bacteriana, e semearam-se amostras de linfonodo mesentérico (A) e fígado (B) em meio BHI (Brain Heart Infusion). A figura ilustra o aumento da translocação bacteriana em linfonodo mesentérico e fígado após a indução da mucosite por irinotecano. Os valores são apresentados como média e E.P.M das Unidades Formadoras de colônias (UFC) por g. de tecido. * $P < 0,05$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

TABELA 4- Identificação bioquímica de bacilos Gram negativos translocadas em órgãos estéreis após a injeção de Irinotecano

BACTERIA	SALINA		IRI, 5dia		IRI, 7dia	
	MLN	Fígado	MLN	Fígado	MLN	Fígado
<i>Escherichia coli</i>	0% (0/8)	0% (0/8)	75% (6/8)	62,5% (5/8)	71,42% (5/7)	42,86% (3/7)
<i>Citrobacter sp.</i>	0% (0/8)	12,5% (1/8)	25% (2/8)	12,5% (1/8)	0% (0/7)	14,35% (1/7)
BGNMF	50% (4/8)	37,5% (3/8)	50% (4/8)	75% (6/8)	42,86% (3/7)	28,6% (2/7)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0% (0/8)	0% (0/8)	12,5% (1/8)	25% (2/8)	14,35% (1/7)	14,35% (1/7)

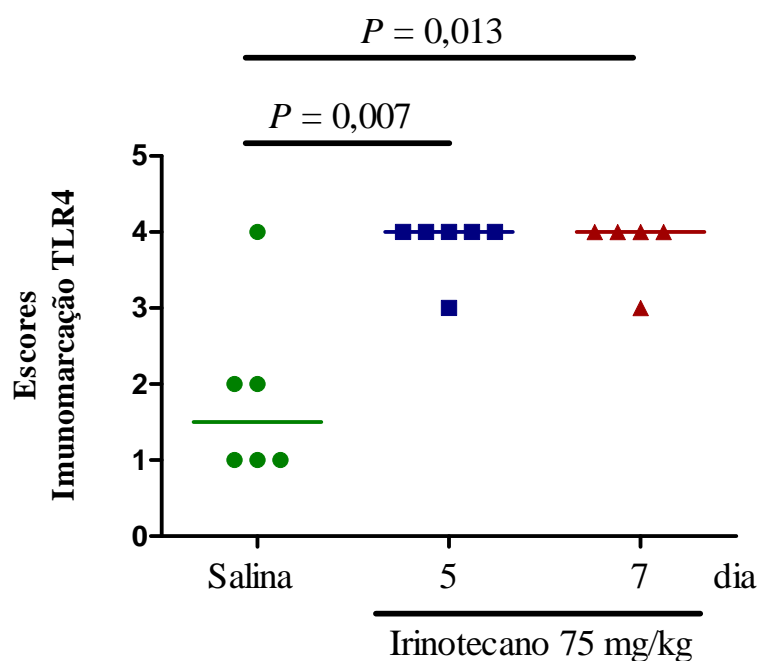
MLN: Linfonodo mesentérico. BGNMF: Bactérias gram negativas não fermentadoras. A tabela ilustra a percentagem de enterobactérias identificadas através do Kit bioquímico da Probac.

FIGURA 29 – Imunomarcação do receptor Toll-like-4 (TLR4) em amostras de intestino de camundongos injetados com irinotecano



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. Segmento de íleo foi coletado e processado para a realização da imunohistoquímica para receptor Toll-like tipo 4 (TLR4) (aumento de 400x). **Painel A:** Controle negativo (Background). **Painel B:** Salina. **Painel C:** Irinotecano, 5 dia. **Painel D:** Irinotecano, 7 dia.

FIGURA 30 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de imunomarcção do receptor Toll-like 4 (TLR4) em amostras intestinais de camundongos



Os animais receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto e sétimo dia experimental. O íleo foi coletado para a realização da imunohistoquímica para receptor Toll-like tipo 4 (TLR4). Os valores são apresentados como mediana dos escores de imunomarcção para TLR4. $P < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

4.4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA ADAPTADORA MYD88, RECEPTORES TOLL LIKE E NOD1 NA MUCOSITE INDUZIDA PELO IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS

4.4.1 Avaliação da participação da Proteína Adaptadora MyD88 na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano

A **Figura 31** ilustra que o irinotecano promoveu uma significativa ($P < 0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente em camundongos selvagens (WT) quando comparado ao grupo controle injetado apenas com salina (WT). Em animais *knockout* para MyD88 (MyD88^{-/-}), aos quais foi administrado IRI, observou-se um aumento parcial significativo ($P < 0,05$) da massa corpórea no sétimo dia após a primeira administração do antineoplásico quando comparado com os animais selvagens que receberam IRI.

Adicionalmente, como mostrado na **Figura 32**, verificou-se que o irinotecano induziu significativa diarreia ($P < 0,05$) em camundongos selvagens, de grau moderado a grave (2 [1-3]) quando comparado ao grupo salina WT (0 [0-0]). A **Figura 31** apresenta também que a deficiência gênica da proteína adaptadora MyD88 não apresentaram ($P < 0,05$) eventos de diarreia (0 [0-1]) após a injeção de irinotecano quando comparado com o grupo WT que receberam irinotecano.

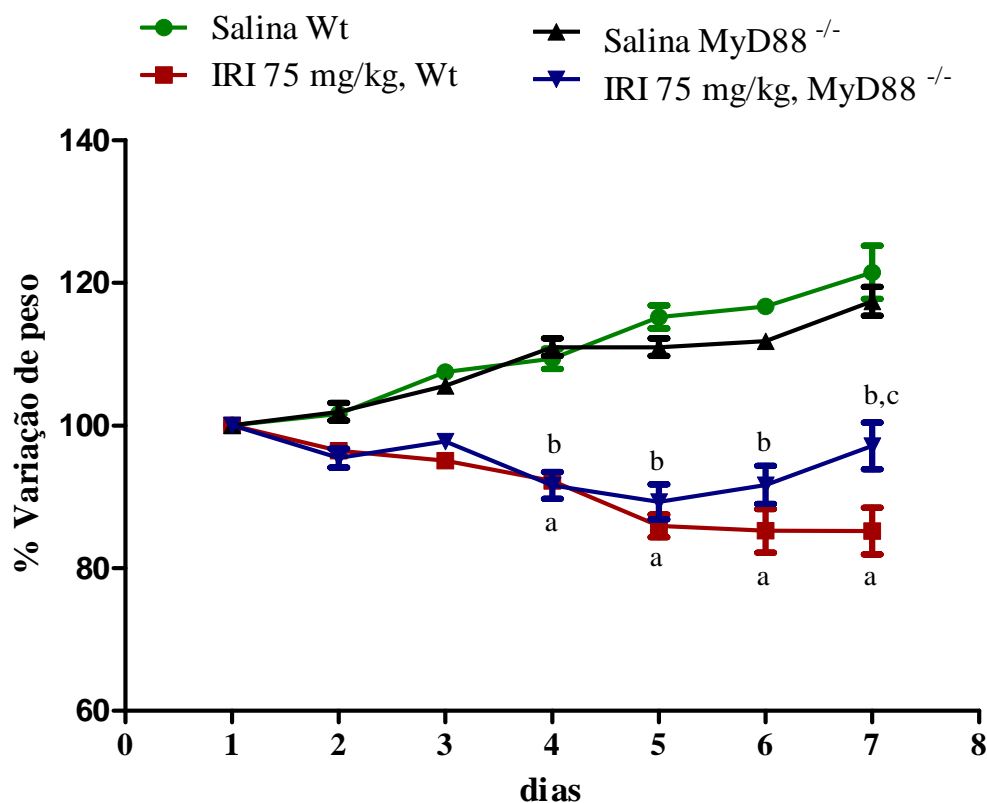
A análise morfométrica (**Figura 33**) revelou que animais selvagens injetados com irinotecano (75 mg/kg, i.p.) apresentaram uma significativa redução ($P < 0,05$) na altura do vilo e razão vilo/cripta quando comparados com animais selvagens administrados somente com salina. A **Figura 33** apresenta também que animais MyD88^{-/-}, que receberam IRI, mostraram uma tenuous das alterações morfométricas em comparação com animais selvagens injetados com irinotecano. As fotomicrografias do jejuno (**Figura 34**) e íleo (**Figura 35**) indicam que o irinotecano na dose de 75 mg/kg/dia, em comparação com animais WT (C57BL/6) injetados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilo e infiltração inflamatória na

mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade do epitélio de revestimento. Em animais *knockout* para MyD88, aos quais foi administrado irinotecano, observou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes *knockout* administrados apenas com salina e/ou camundongos WT injetados com irinotecano.

Na **Figura 36** observa-se que o irinotecano induziu uma significativa ($P<0,05$) leucopenia nos animais selvagens (39%) e *knockout* para MyD88 (29,5%) quando comparado com o controle injetado apenas com salina. O efeito pro-inflamatório do IRI (75 mg/kg, i.p.) sobre o jejuno (**Figura 37A**) e íleo (**Figura 37B**) foi detectado pelo aumento significativo ($P<0,05$) da infiltração de neutrófilos através da determinação da atividade de MPO versus salina WT. Esse efeito não foi observado em animais MyD88^{-/-} injetados com irinotecano ($P<0,05$), quando comparado com os animais selvagens que receberam IRI.

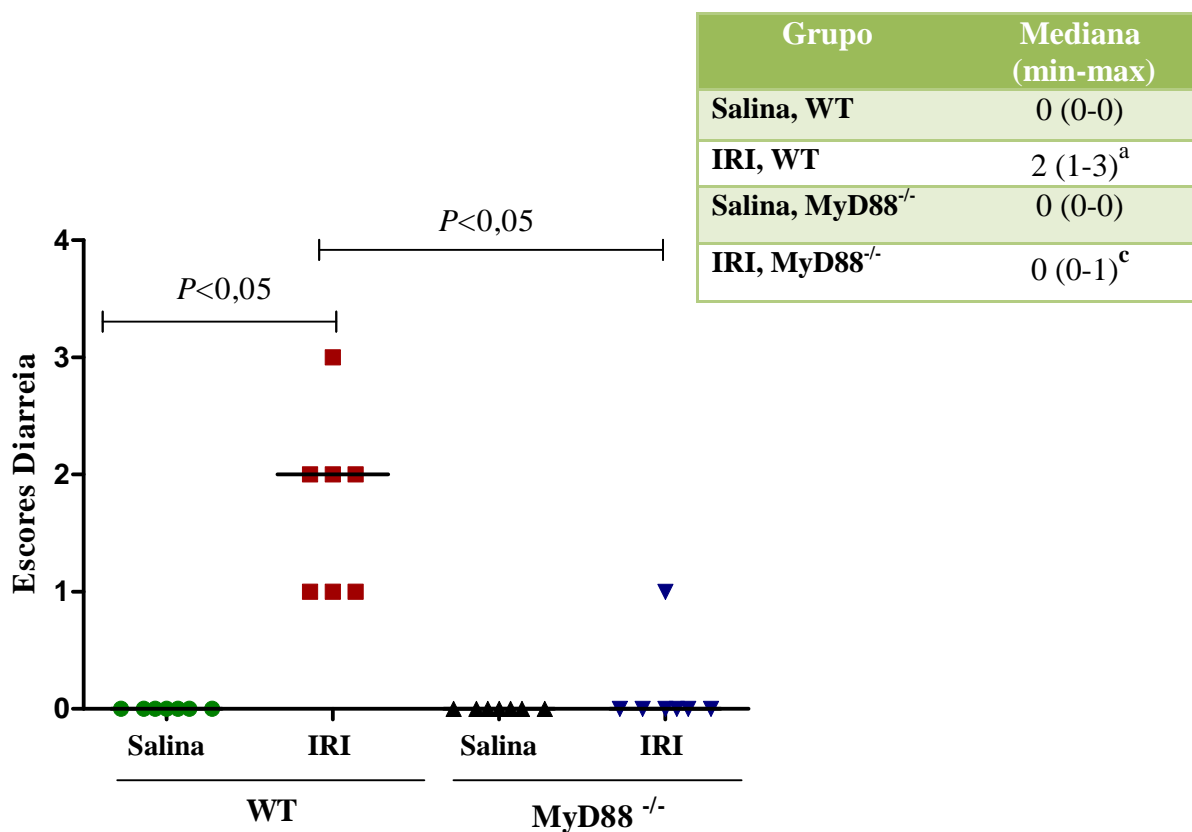
A **Tabela 5** e **Figura 38A** apresentam respectivamente o crescimento qualitativo e quantitativo de bactérias circulantes após a indução da mucosite por irinotecano em animais selvagens e *knockout* para MyD88. Os resultados evidenciam um menor crescimento de bactérias ($P<0,05$) no sangue em animais MyD88^{-/-} quando comparado com os animais selvagens que receberam irinotecano. Adicionalmente, a **Figura 38B** ilustra o aumento significativo ($P<0,05$) de bactérias no fígado em animais WT injetados com IRI, versus o grupo salina. Os animais deficientes da proteína MyD88 apresentaram crescimento de bactérias no fígado induzido pelo irinotecano.

FIGURA 31 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso em camundongos MyD88^{-/-} em função do tempo



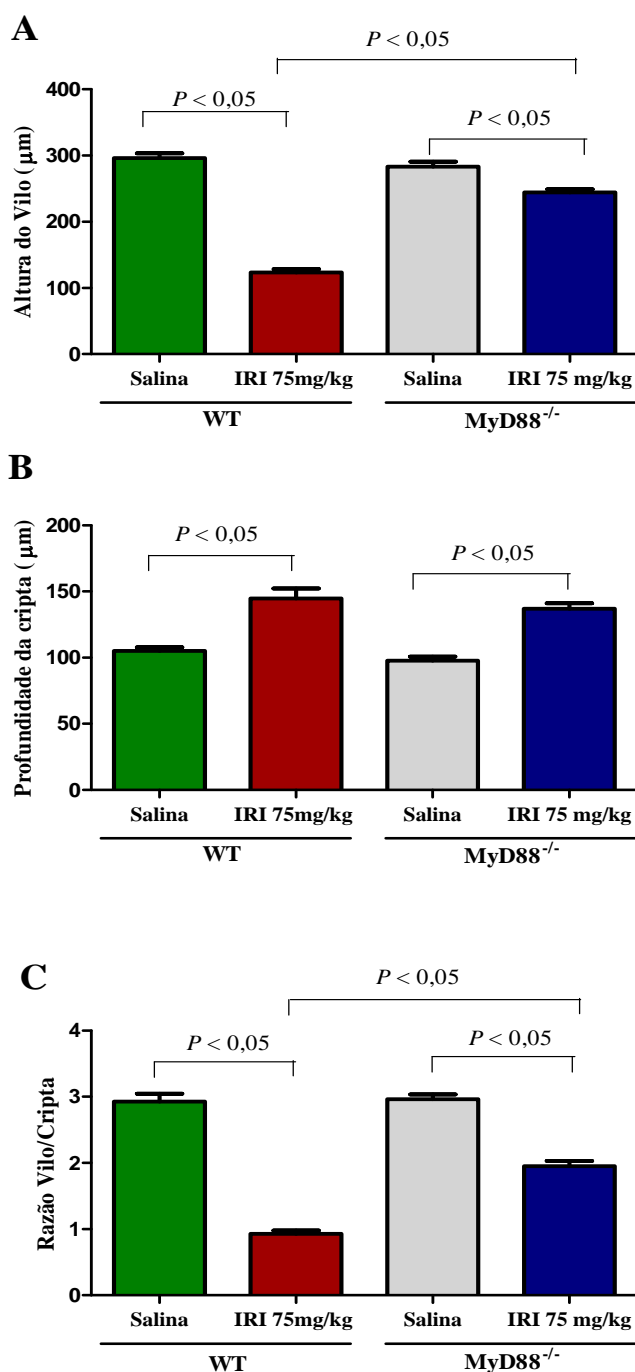
Os animais wild type (WT) e *knockout* para MyD88 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. Os camundongos foram pesados diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam a média ± EPM (Erro padrão da média) do percentual de variação do peso comparado ao peso inicial. ^aP<0,05 vs salina wt. ^bP<0,05 vs salina MyD88^{-/-}. ^cP<0,05 vs IRI MyD88^{-/-}. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 32 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos *Myd88*^{-/-}



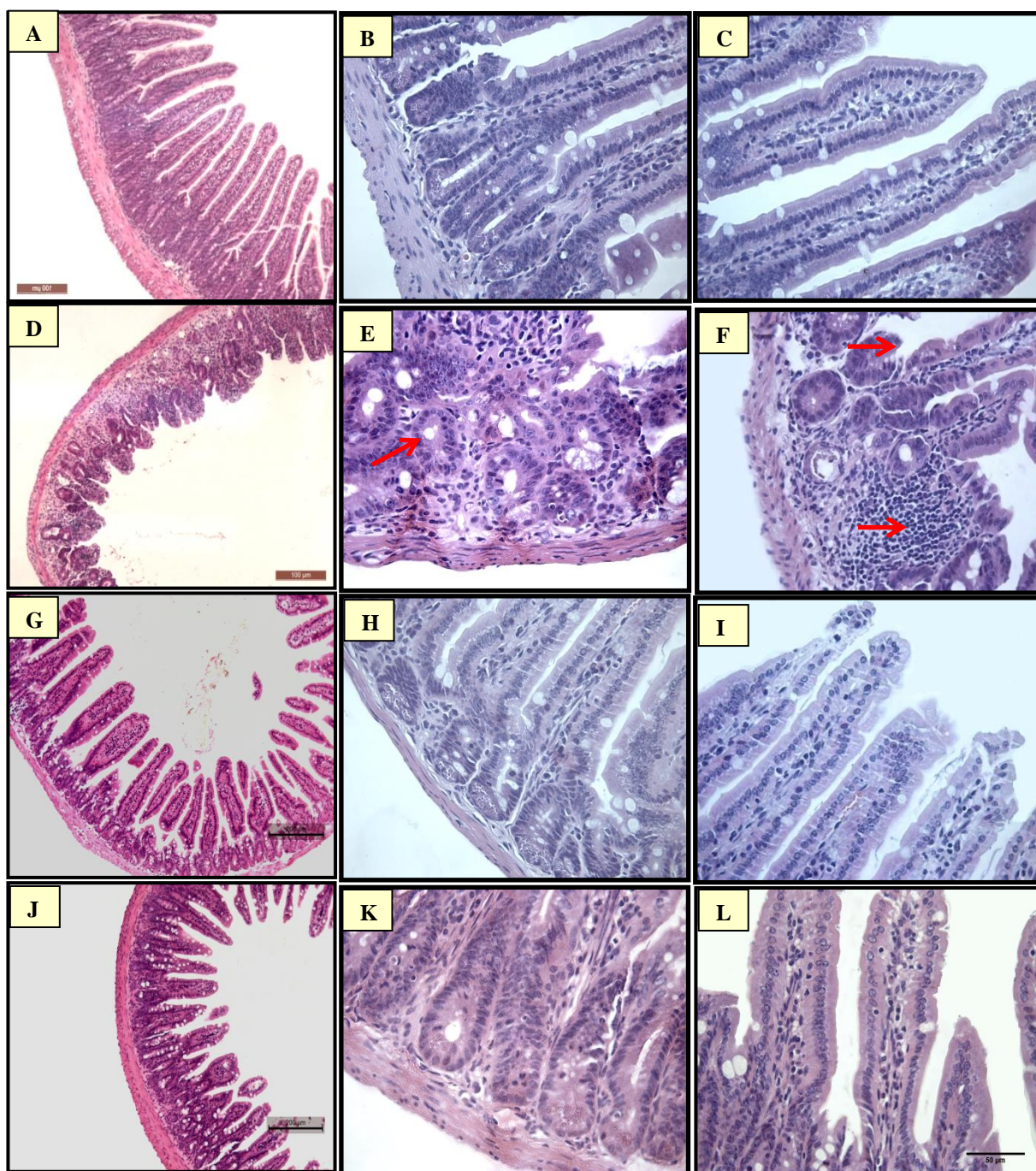
Os animais selvagens e *knockout* para MyD88 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e avaliados a diarreia através de escores no sétimo dia experimental. Os valores representam à mediana e variação dos escores de diarreia. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina, WT. ^c $P < 0,05$ vs grupo Irinotecano, WT. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 33 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica em amostras de jejuno de camundongos *Myd88*^{-/-}



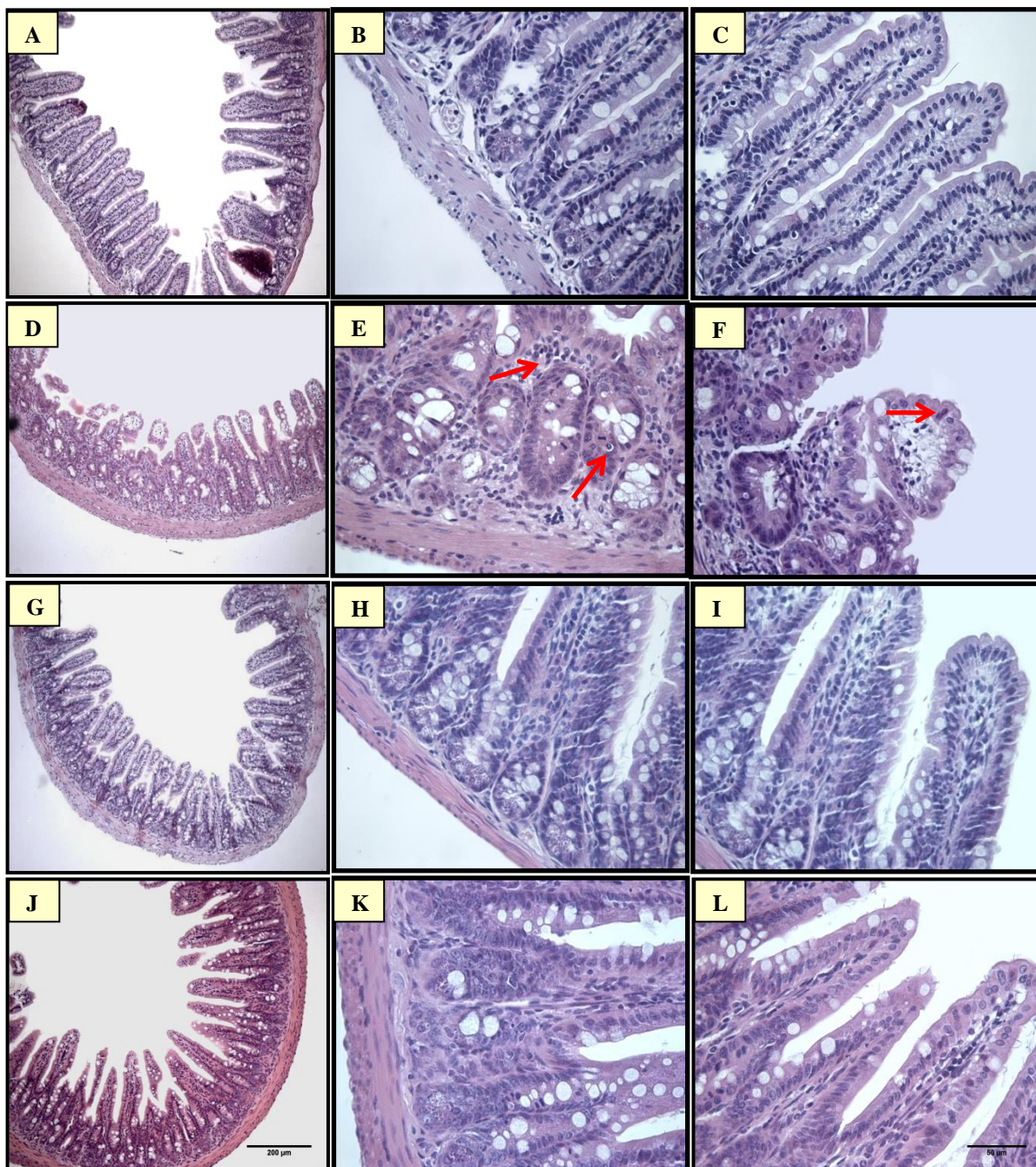
Os animais WT e *Myd88*^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de jejuno foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E (100x) para posterior análise morfométrica. O gráfico mostra o efeito de irinotecano sobre a altura do vilo (**Painel A**), profundidade da cripta (**Painel B**) e razão vilo/cripta (**Painel C**) em camundongos *MyD88*^{-/-}. Os valores representam a média ± EPM. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 34 – Fotomicrografias de amostras de jejuno de camundongos *Myd88*^{-/-} após a injeção de irinotecano



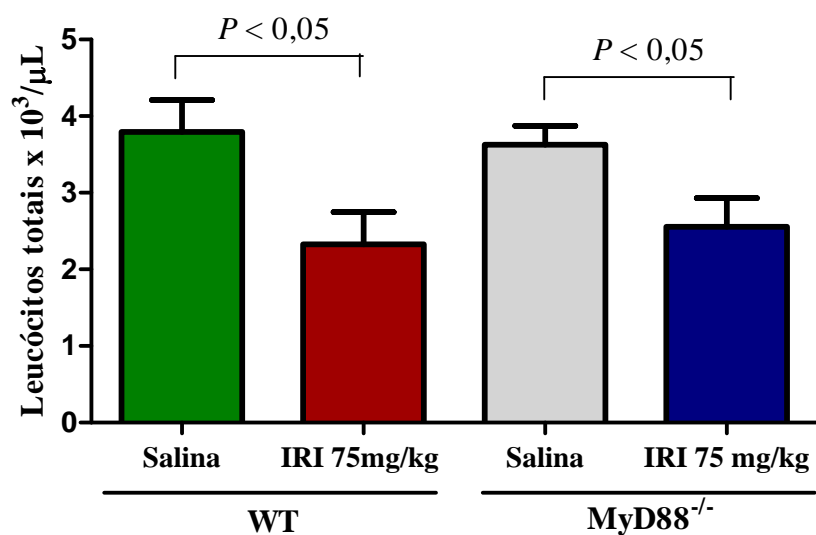
Os animais WT e *MyD88*^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de jejuno foram removidos e processados para a técnica de coloração H&E para posterior análise histopatológica. Na mucosa dos animais WT que receberam IRI, os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas. Nos animais *MyD88*^{-/-} há maior preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** Salina WT, 100x; **Painel B-C:** salina WT, 400x (cripta-vilo). **Painel D:** IRI WT, 100x; **Painel E-F:** IRI WT, 400x (cripta-vilo). **Painel G:** salina *MyD88*^{-/-}, 100x; **Painel H-I:** salina *MyD88*^{-/-}, 400x (cripta-vilo). **Painel J:** IRI *MyD88*^{-/-}, 100x; **Painel K-L:** IRI *MyD88*^{-/-}, 400x (cripta-vilo).

FIGURA 35 – Fotomicrografias de amostras de íleo de camundongos *Myd88*^{-/-} após a injeção do irinotecano



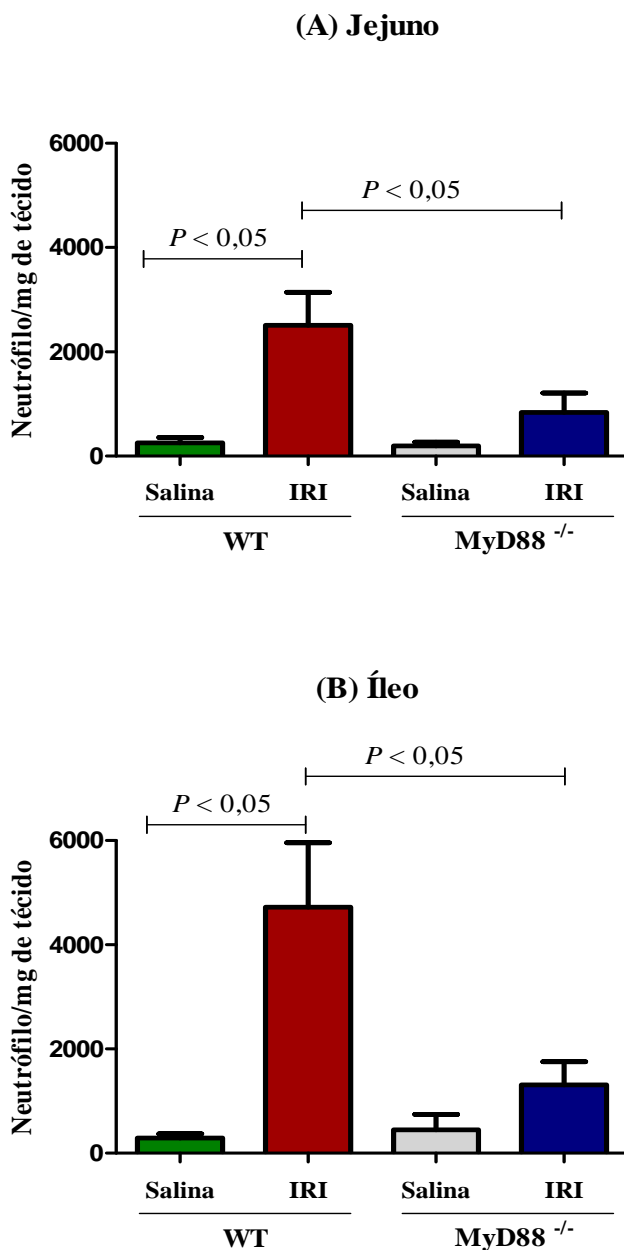
Os animais WT e *MyD88*^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração H&E para posterior análise histopatológica. Na mucosa dos animais WT que receberam IRI, os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas. Nos animais *MyD88*^{-/-} há maior preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** Salina WT, 100x; **Painel B-C:** salina WT, 400x (cripta-vilo). **Painel D:** IRI WT, 100x; **Painel E-F:** IRI WT, 400x (cripta-vilo). **Painel G:** salina *MyD88*^{-/-}, 100x; **Painel H-I:** salina *MyD88*^{-/-}, 400x (cripta-vilo). **Painel J:** IRI *MyD88*^{-/-}, 100x; **Painel K-L:** IRI *MyD88*^{-/-}, 400x (cripta-vilo).

FIGURA 36 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos Myd88^{-/-}



Os animais WT e MyD88^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sétimo dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital e realizou-se a contagem dos leucócitos totais no contador automático de células - Coulter. Os valores representam a média \pm E.P.M do numero de leucócitos totais x $10^3/\mu\text{L}$. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 37 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmento de jejuno e íleo de camundongos *MyD88*^{-/-}



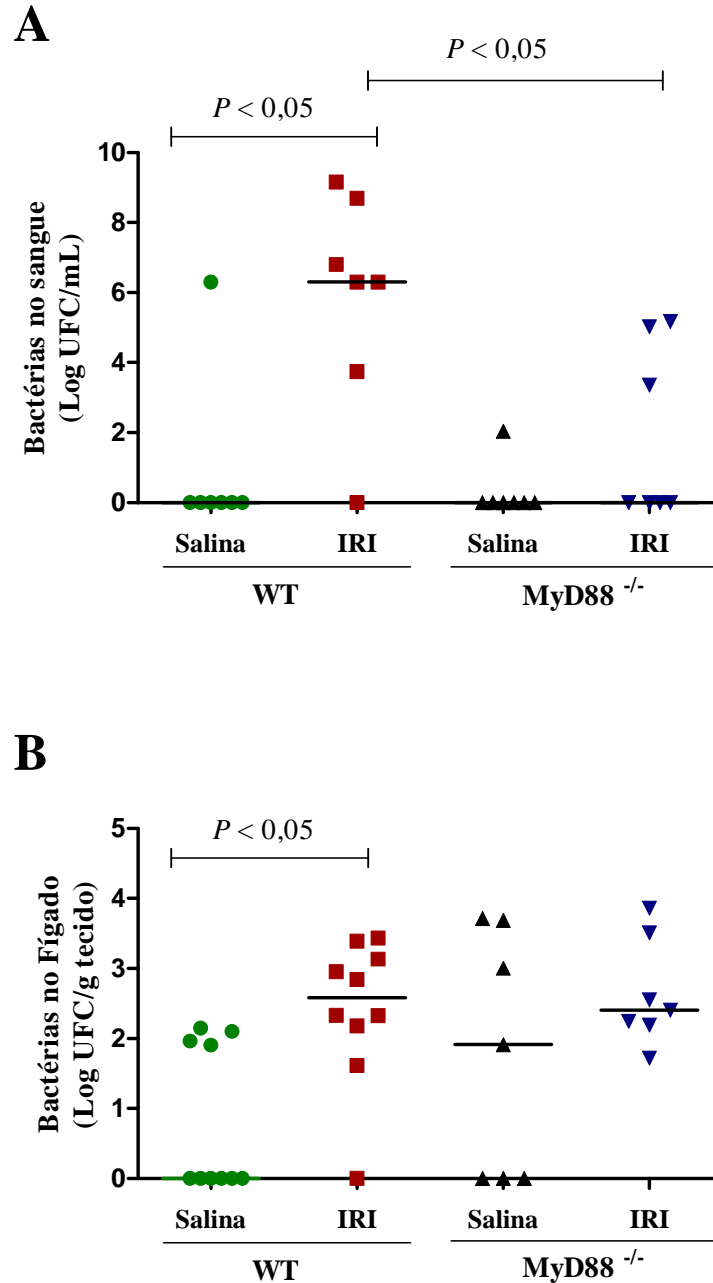
Os animais WT e *Myd88*^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sétimo dia experimental. Amostras de jejuno e íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O gráfico mostra o efeito do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos no jejuno (A) e íleo (B) de camundongos *MyD88*^{-/-}. Os valores representam a média ± E.P.M do número de neutrófilos por mg. de tecido. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

TABELA 5 – Percentagem de bacteremia em camundongos MyD88^{-/-} após a injeção de irinotecano

Grupo	Bacteremia	
	48h	%
Salina, WT	1/7	14,28%
IRI, WT	6/7	85,71%
Salina, MyD88 -/-	1/7	14,28%
IRI, MyD88 -/-	3/7	42,87%

O crescimento de bactérias foi avaliado no sangue, após sete dias da indução da mucosite nos camundongos WT e MyD88^{-/-}. O crescimento bacteriano foi estimado pela turvação do caldo BHI contendo o sangue das amostras durante 48 h de incubação na estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos como percentagem de crescimento bacteriano.

FIGURA 38 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue e fígado de camundongos MyD88^{-/-}



Os animais WT e MyD88^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. O número de bactérias no sangue e fígado foi avaliado após sete dias da indução da mucosite nos camundongos WT e MyD88^{-/-}. O número total de bactérias foi estimado pelo cultivo das amostras em placas contendo meio Mueller-Hinton por 48 h de incubação na estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos como Log do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de sangue (**Painel A**) e como Log UFC por g. de tecido (**Painel B**). $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

4.4.2 Avaliação da participação do Receptor *Toll like* tipo 2 (TLR2) na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano

Na **Figura 39** observa-se que o irinotecano causou uma significativa ($P<0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente em camundongos selvagens (WT) quando comparado ao grupo controle injetado somente com salina (WT). Porém, animais *knockout* para TLR2 (TLR2^{-/-}), aos quais foi administrado irinotecano, observou-se um aumento significativo ($P<0,05$) da massa corpórea quando comparado com os animais WT que receberam irinotecano.

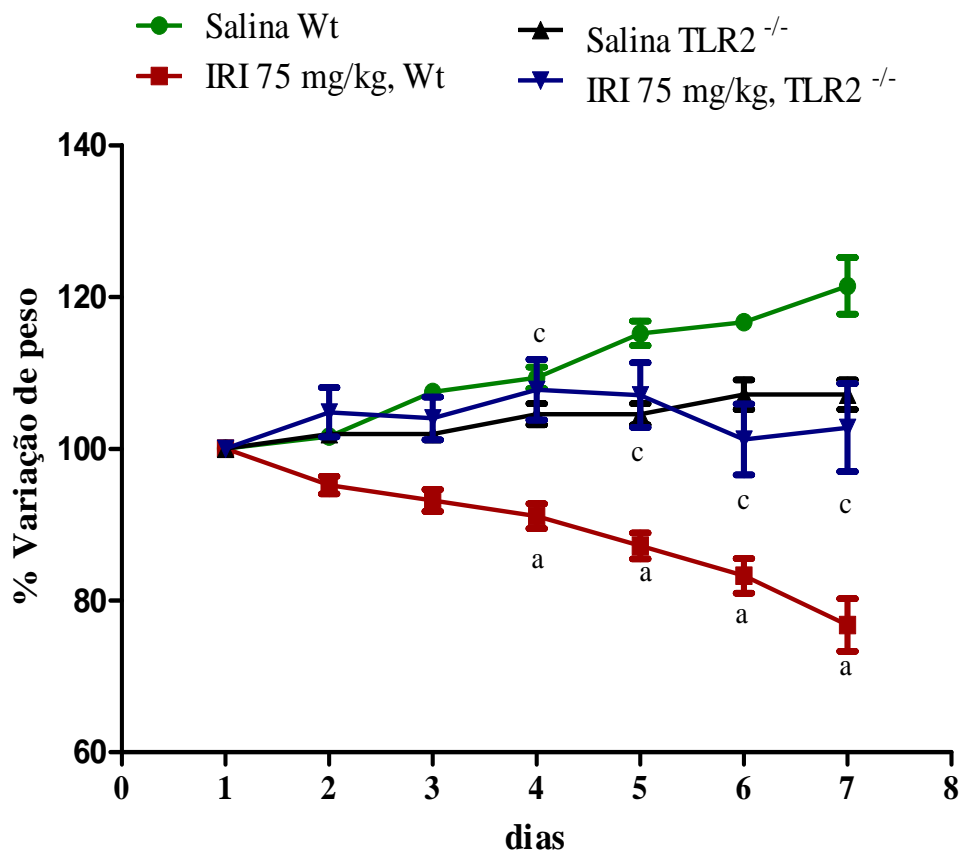
Adicionalmente, como ilustra a **Figura 40**, verificou-se que o irinotecano induziu significativa diarreia ($P<0,05$) em camundongos selvagens, de grau moderado a grave (2 [2-3]) quando comparado ao grupo salina WT (0[0-0]). A **Figura 40** mostra também a deleção gênica para o receptor TLR2 não apresentaram ($P<0,05$) desenvolvimento de diarreia (0 [0-1]) após a injeção de IRI quando comparado com os animais WT que receberam irinotecano.

A análise morfométrica intestinal (**Figura 41**) revelou que animais selvagens injetados com irinotecano (75 mg/kg, i.p.) induziram uma significativa redução ($P<0,05$) na altura do vilos e razão vilos/crípta quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A **Figura 41** apresenta também que animais TLR2^{-/-}, que receberam irinotecano, não desenvolveram alterações nesses parâmetros morfométricos em comparação com animais WT injetados com IRI. As fotomicrografias do jejuno (**Figura 42**) e íleo (**Figura 43**) indicam que o irinotecano na dose de 75 mg/kg/dia, em comparação com animais WT injetados apenas com salina, induziram acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilos e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significante da continuidade do epitélio de revestimento. Em animais TLR2^{-/-}, aos quais foi administrado irinotecano, observou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes *knockout* tratados apenas com salina e/ou camundongos WT injetados com irinotecano.

Na **Figura 44** observa-se que o irinotecano induziu uma significativa ($P<0,05$) leucopenia nos animais selvagens (49,6%) quando comparado com o controle injetado apenas com salina. Entretanto, camundongos TLR2^{-/-} não apresentaram ($P<0,05$) leucopenia relacionada ao tratamento com irinotecano. O efeito pró-inflamatório do IRI (75 mg/kg, i.p.) sobre o jejuno (**Figura 45A**) e íleo (**Figura 45B**) foi detectado pelo aumento significativo ($P<0,05$) da infiltração de neutrófilos através da determinação da atividade de MPO em animais selvagens versus salina WT. Esse efeito não foi observado em animais TLR2^{-/-}, após a injeção de irinotecano ($P<0,05$), quando comparado com os animais WT que receberam IRI.

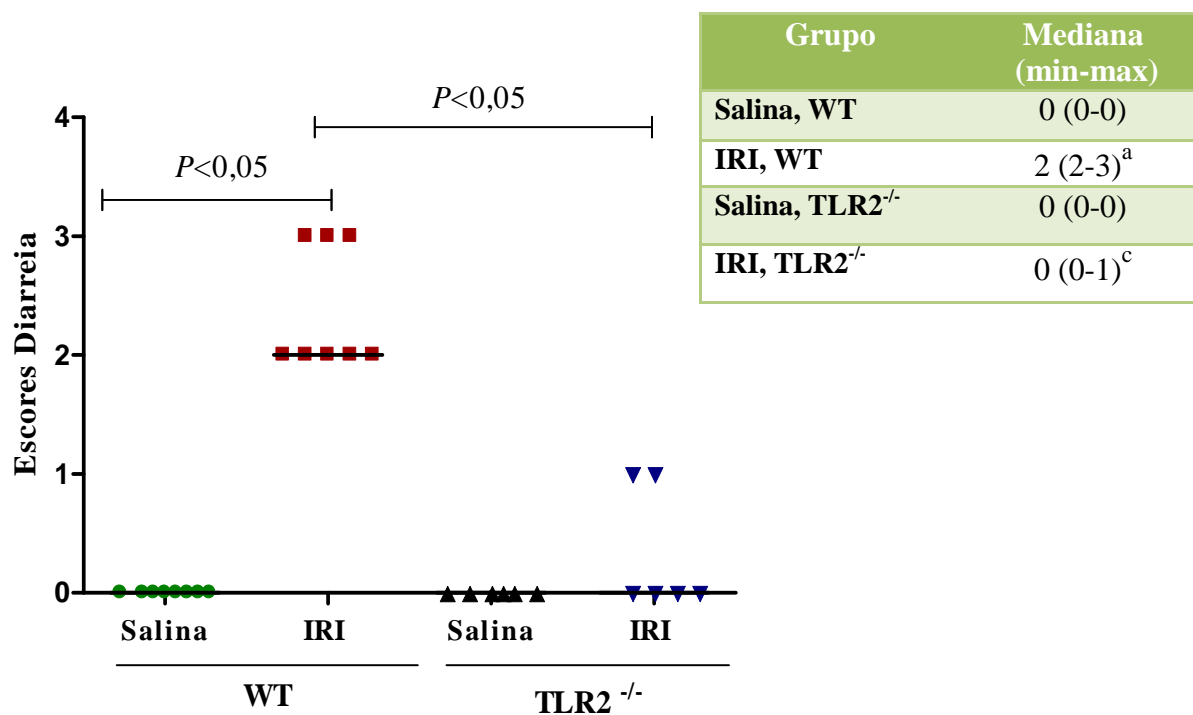
Na avaliação microbiológica, a **Figura 46A** ilustra uma importante bacteremia após a indução da mucosite por irinotecano em animais selvagens. Em animais *knockout* para TLR2 injetados com irinotecano, os resultados demonstram uma menor bacteremia ($P<0,05$) quando comparados com os animais selvagens que receberam Irinotecano. Adicionalmente, a **Figura 46B** mostra o aumento de bactérias no fígado em animais WT injetados com IRI, versus o grupo salina. Porém, animais TLR2^{-/-} que receberam irinotecano não apresentaram redução significativa do crescimento de bactérias naquele órgão ($P>0,05$).

FIGURA 39 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso em camundongos TLR2^{-/-} em função do tempo



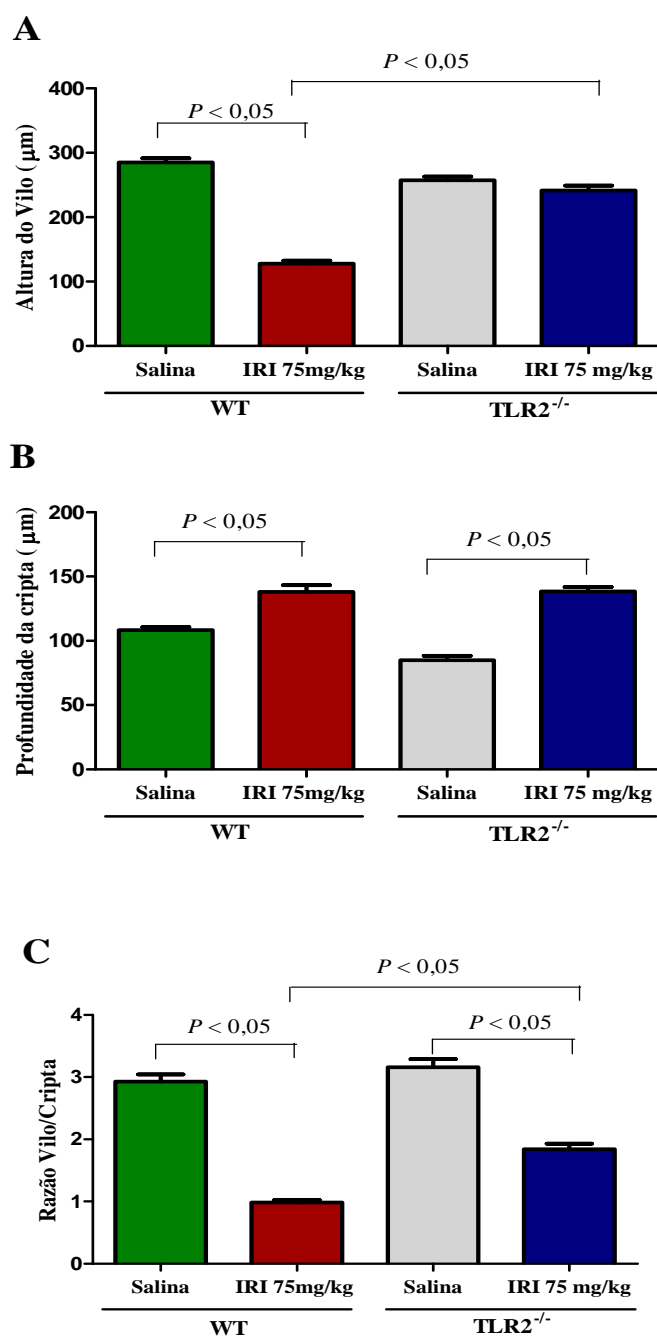
Os camundongos selvagens (WT) e *knockout* para TLR2 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. Os animais foram pesados diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam a média \pm EPM (Erro padrão da média) do percentual de variação do peso comparado ao peso inicial. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina WT. ^c $P < 0,05$ vs grupo IRI WT. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 40 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos TLR2^{-/-}



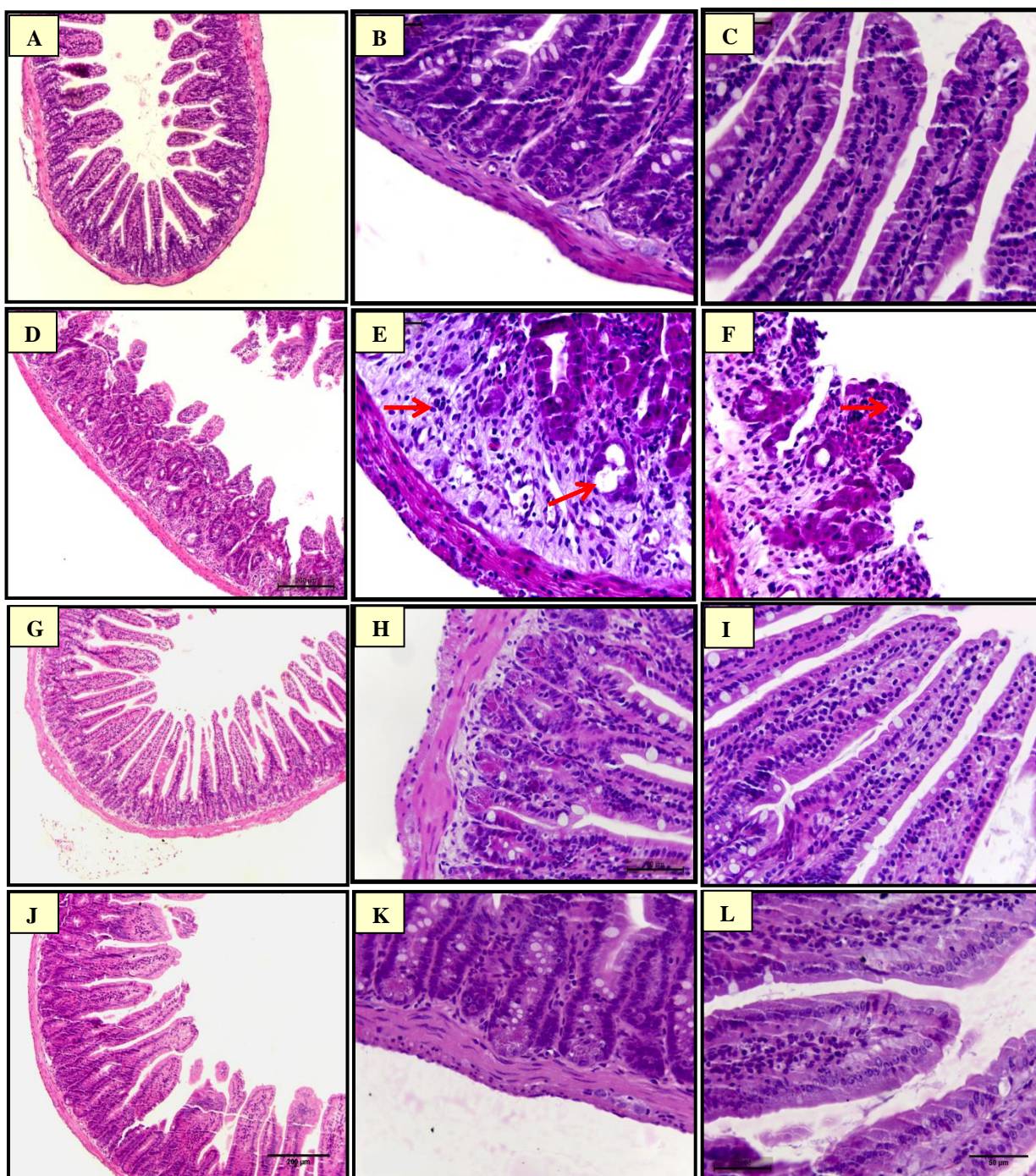
Os animais selvagens e TLR2^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e avaliados a diarreia através de escores no sétimo dia experimental. Os valores representam à mediana e variação dos escores de diarreia. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina, WT. ^c $P < 0,05$ vs grupo IRI, WT. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 41 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica em amostras de jejuno de camundongos TLR2^{-/-}



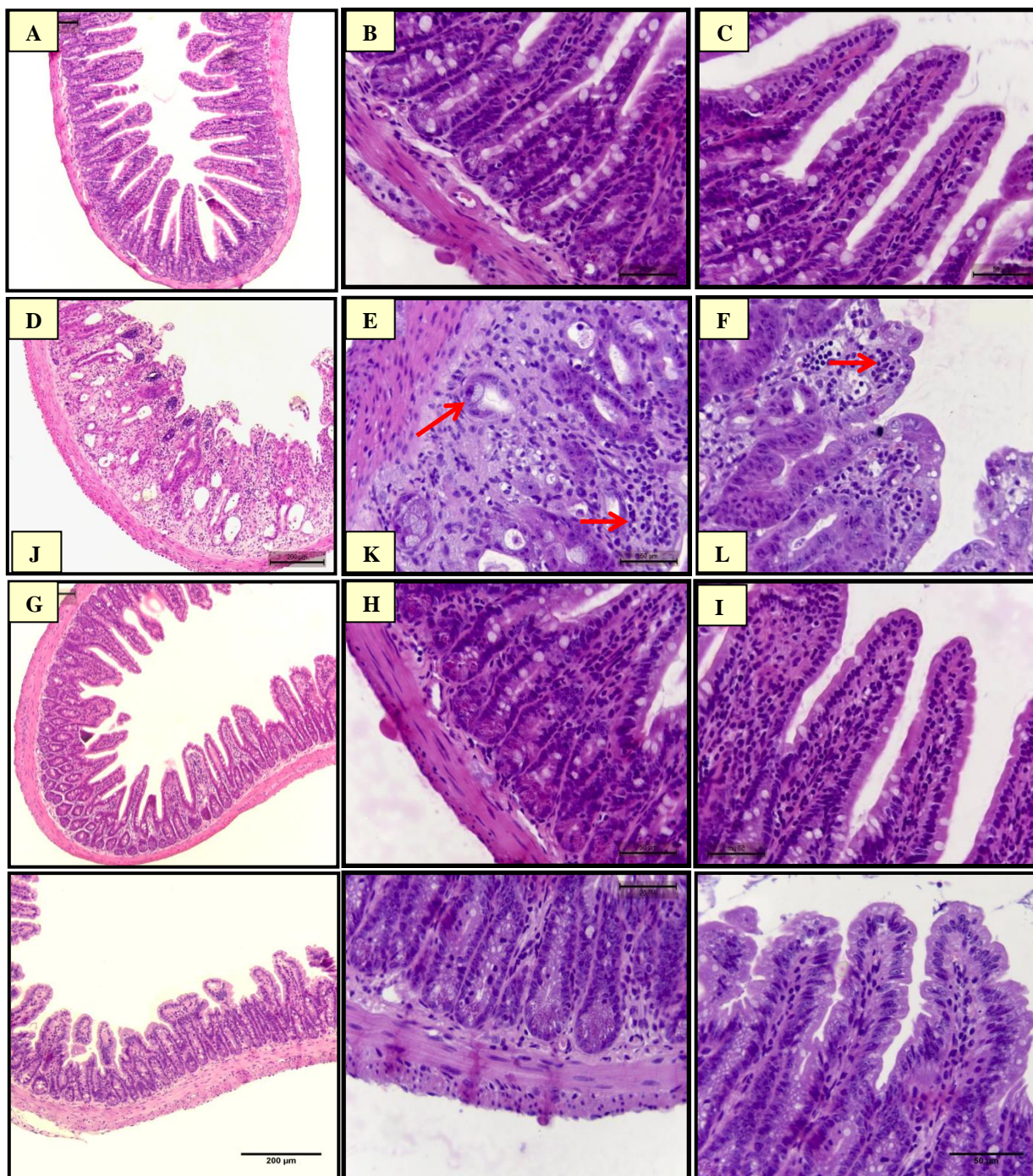
Os animais WT e TLR2^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de jejuno foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E (100x) para posterior análise morfométrica. O gráfico mostra o efeito do irinotecano sobre a altura do vilão (**Painel A**), profundidade na cripta (**Painel B**) e razão vilão/cripta (**Painel C**) em camundongos TLR2^{-/-}. Os valores representam a média ± EPM. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 42 – Fotomicrografias de amostras de jejuno em camundongos TLR2^{-/-} após a injeção de irinotecano



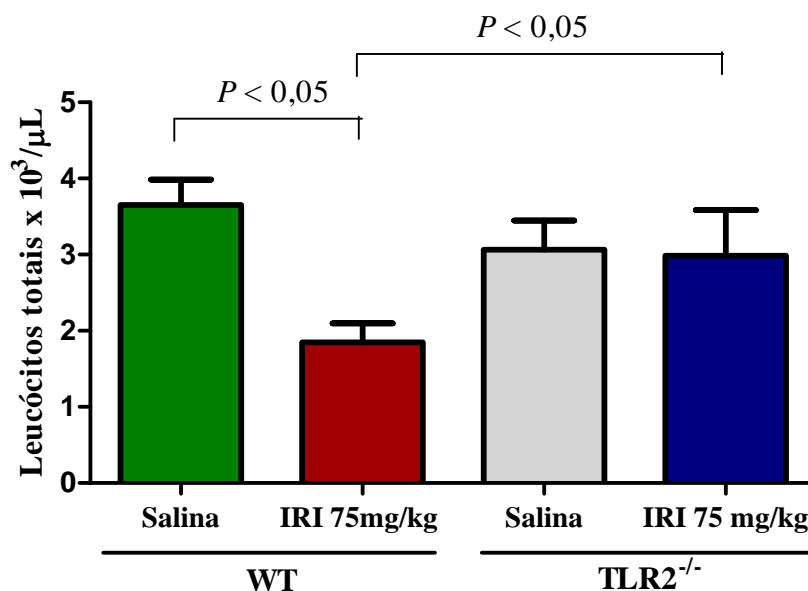
Os animais WT e TLR2^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de jejuno foram removidos e processados para a técnica de coloração H&E para posterior análise histopatológica. Na mucosa dos animais WT que receberam IRI, os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas. Nos animais TLR2^{-/-} há maior preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** salina WT, 100x; **Painel B-C:** salina WT, 400x (cripta-vilo). **Painel D:** IRI WT, 100x; **Painel E-F:** IRI WT, 400x (cripta-vilo). **Painel G:** salina TLR2^{-/-}, 100x; **Painel H-I:** salina TLR2^{-/-}, 400x (cripta-vilo). **Painel J:** IRI TLR2^{-/-}, 100x; **Painel K-L:** IRI TLR2^{-/-}, 400x (cripta-vilo).

FIGURA 43 – Fotomicrografias de amostras de íleo em camundongos TLR2^{-/-} após a injeção de irinotecano



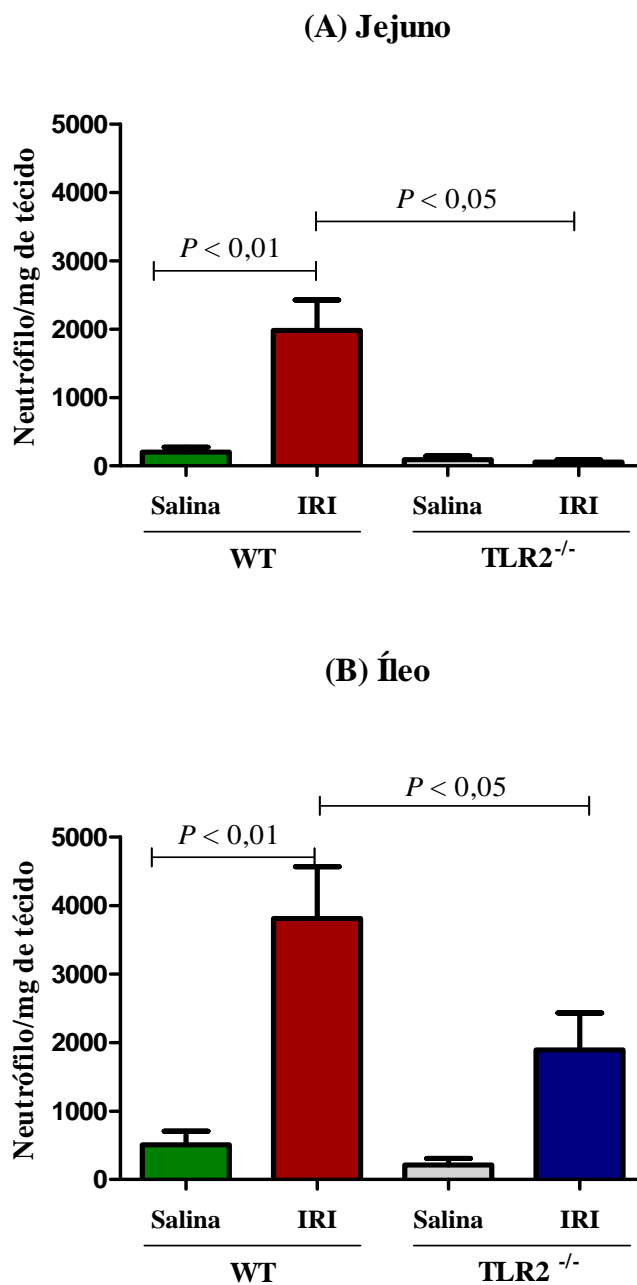
Os animais WT e TLR2^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração H&E para posterior análise histopatológica. Na mucosa dos animais WT que receberam IRI, os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas. Nos animais TLR2^{-/-} há maior preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** salina WT, 100x; **Painel B-C:** salina WT, 400x (cripta-vilo). **Painel D:** IRI WT, 100x; **Painel E-F:** IRI WT, 400x (cripta-vilo). **Painel G:** salina TLR2^{-/-}, 100x; **Painel H-I:** salina TLR2^{-/-}, 400x (cripta-vilo). **Painel J:** IRI TLR2^{-/-}, 100x; **Painel K-L:** IRI TLR2^{-/-}, 400x (cripta-vilo).

FIGURA 44 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos TLR2^{-/-}



Os animais WT e TLR2^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sétimo dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital e realizou-se a contagem dos leucócitos totais no contador automático de células - Coulter. Os valores representam a média ± E.P.M do número de leucócitos totais x 10³/μL. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 45 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmento de jejuno e íleo de camundongos TLR2^{-/-}



Os animais WT e TLR2^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sétimo dia experimental. Amostras de jejuno e íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O gráfico mostra o efeito do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos no jejuno (**A**) e íleo (**B**) de camundongos TLR2^{-/-}. Os valores representam a média ± E.P.M do número de neutrófilos por mg. de tecido. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

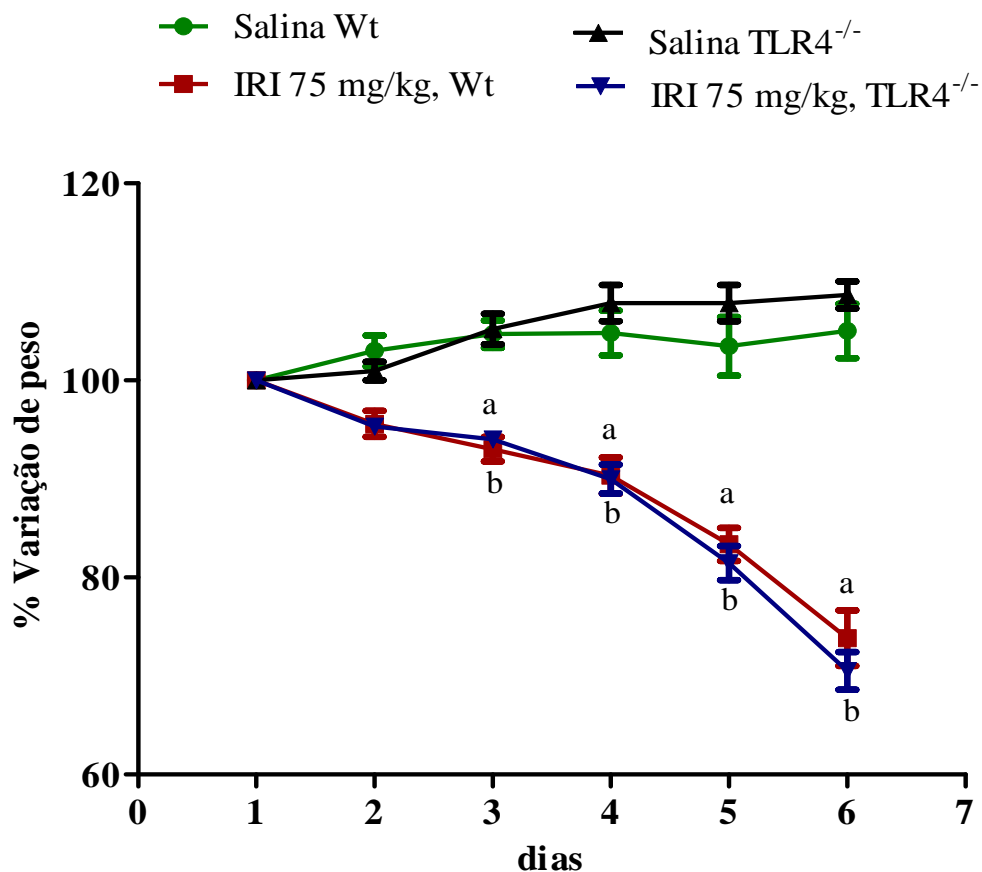
4.4.3 Avaliação da participação do Receptor *Toll like* tipo 4 (TLR4) na mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano

Na **Figura 47** observa-se que o irinotecano causou uma significativa ($P<0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente em camundongos WT quando comparado ao grupo controle injetado somente com salina (WT). Além disso, animais *knockout* para TLR4 (TLR4^{-/-}), que receberam IRI, apresentaram perda ponderal significativa ($P>0,05$) quando comparado com os animais TLR2^{-/-} injetados com salina. Adicionalmente, como mostra a **Figura 48**, verificou-se que o irinotecano induziu significativa diarreia ($P<0,05$) tanto em camundongos selvagens (1 [1-3]), como em animais *knockout* para TLR4 (2 [0-3]), quando comparado ao grupo salina (0[0-0]).

Adicionalmente, o irinotecano induziu uma significativa ($P<0,05$) leucopenia nos animais selvagens (54,5%) e TLR4^{-/-} (64,4%) quando comparado aos respectivos controles injetados apenas com salina (**Figura 49**). O efeito pró-inflamatório do IRI (75 mg/kg, i.p.) sobre o jejuno (**Figura 50A**) e íleo (**Figura 50B**) foi detectado pelo aumento significativo ($P<0,05$) da infiltração de neutrófilos através da determinação da atividade de MPO, tanto em animais selvagens como em TLR4^{-/-} versus controle salina WT e *knockout*, respectivamente.

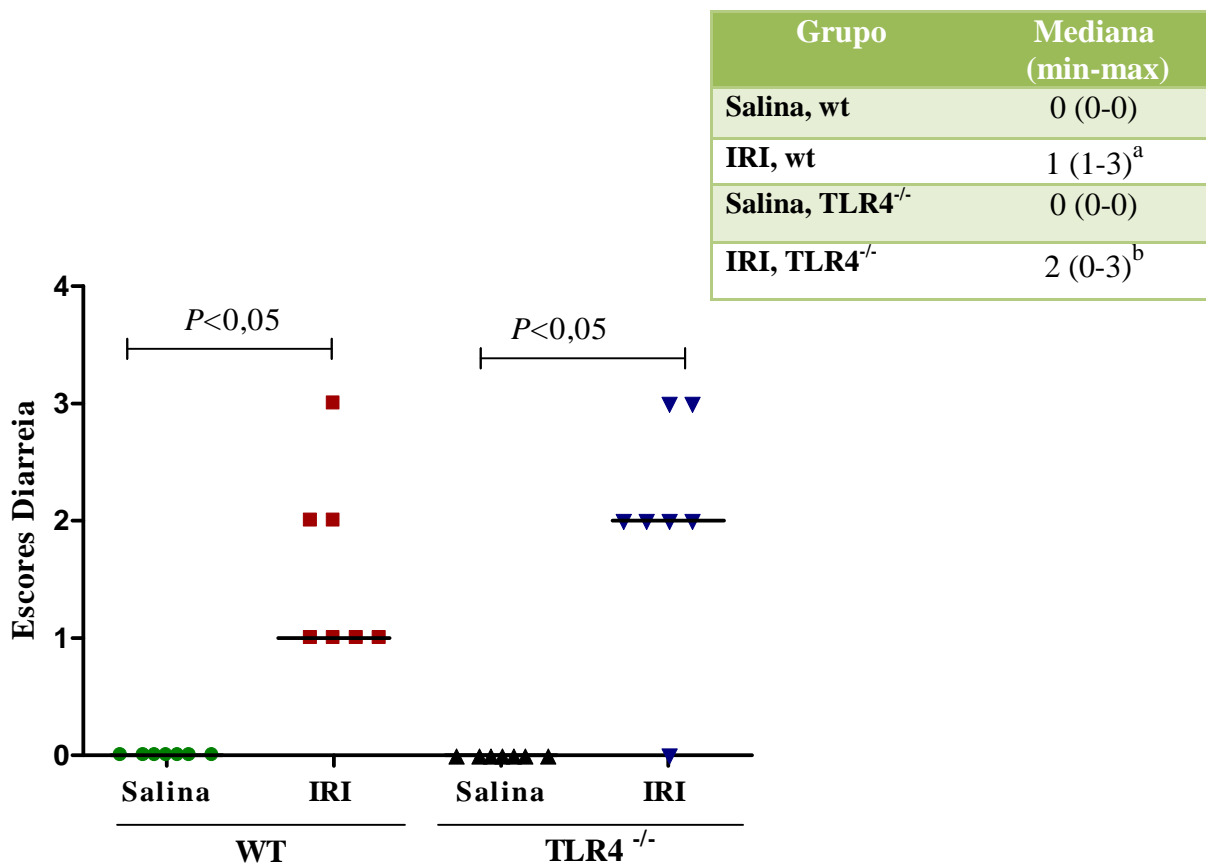
Na **Tabela 6** evidenciou-se uma importante bacteremia em animais selvagens e *knockout* para TLR4 após a injeção de irinotecano quando comparado com seus respectivos controle salina.

FIGURA 47 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso em camundongos $TLR4^{-/-}$ em função do tempo



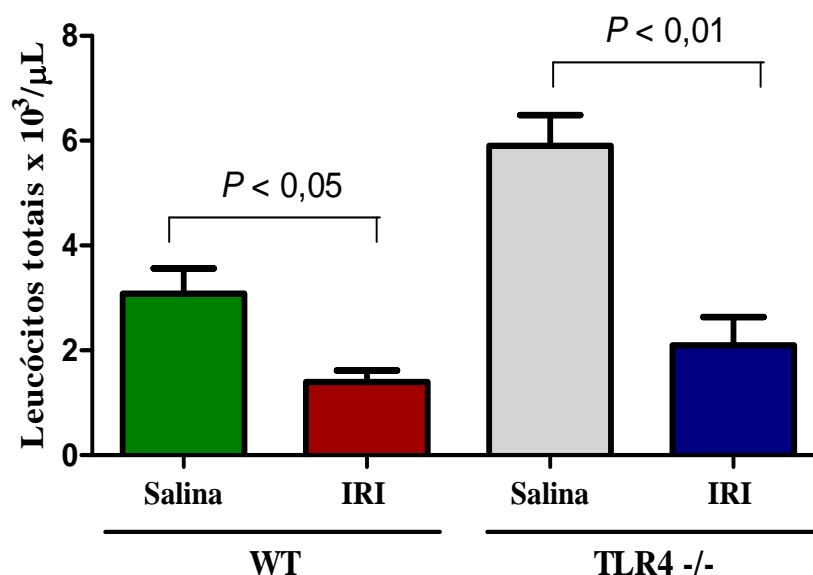
Os animais wild type (WT) e *knockout* para TLR4 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. Os camundongos foram pesados diariamente até o sexto dia experimental. Os pontos representam a média \pm EPM (Erro padrão da média) do percentual de variação do peso comparado ao peso inicial. ^a $P < 0,05$ vs salina WT. ^b $P < 0,05$ vs salina $TLR4^{-/-}$. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 48 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos TLR4^{-/-}



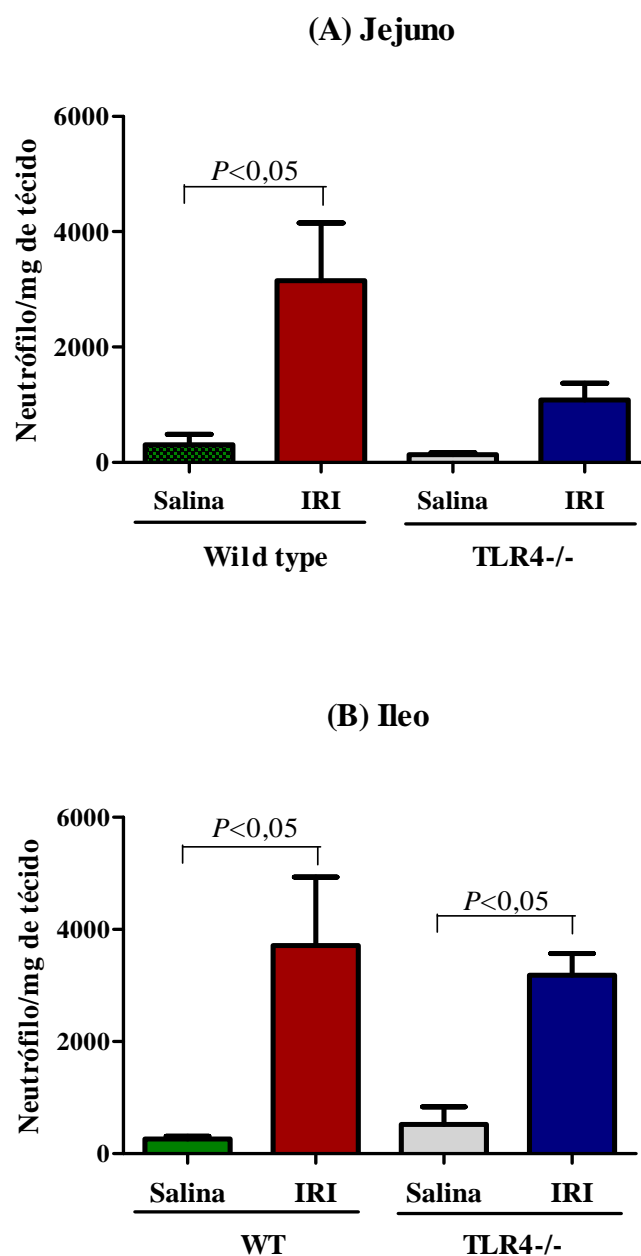
Os animais wild type e TLR4^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e avaliados a diarreia através de escores no sexto dia experimental. Os valores representam à mediana e variação dos escores de diarreia. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina, WT. ^b $P < 0,05$ vs Salina TLR4^{-/-}. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 49 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos TLR4^{-/-}



Os animais wild type e TLR4^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sexto dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital e realizou-se a contagem dos leucócitos totais no contador automático de células - Coulter. Os valores representam a média ± E.P.M do numero de leucócitos totais x 10³/μL. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 50 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais de camundongos TLR4^{-/-}



Os animais WT e TLR4^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sexto dia experimental. Amostras de jejuno e íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O gráfico mostra o efeito do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos no jejuno (A) e íleo (B) de camundongos TLR4^{-/-}. Os valores representam a média ± E.P.M do número de neutrófilos por mg. de tecido. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

TABELA 6 – Percentagem de bacteremia em camundongos TLR4^{-/-} após a injeção de irinotecano

Grupo	Bacteremia	Percentagem
	48%	
Salina, WT	0/6	0%
Irinotecano, WT	5/6	83,3 %
Salina, TLR4^{-/-}	0/6	0%
Irinotecano, TLR4^{-/-}	5/7	71,42%

O crescimento de bactérias foi avaliado no sangue, após sete dias da indução da mucosite nos camundongos WT e TLR4^{-/-}. O crescimento bacteriano foi estimado pela turvação do caldo BHI contendo o sangue das amostras durante 48 h de incubação na estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos como percentagem de crescimento bacteriano.

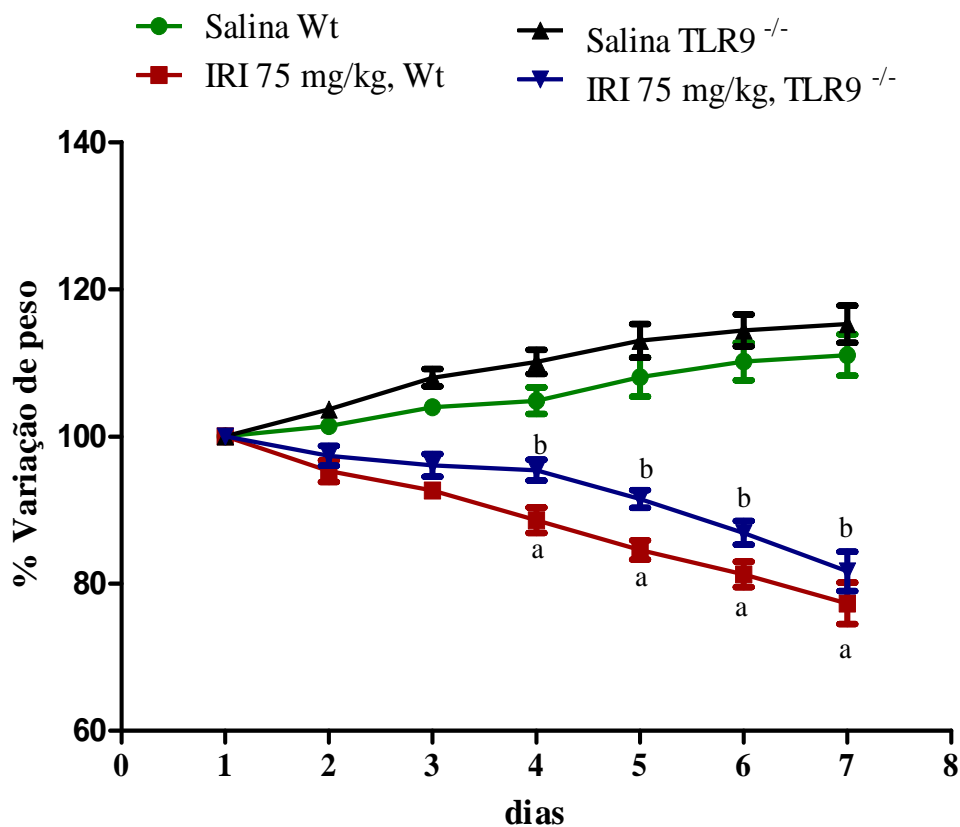
4.4.4 Avaliação da participação do Receptor *Toll like* tipo 9 (TLR9) na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano

A **Figura 51** ilustra que o irinotecano causou uma significativa ($P<0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente, tanto em camundongos WT, como animais *knockout* para TLR9 (TLR9^{-/-}) quando comparados aos respectivos controles injetados com salina. Adicionalmente, a **Figura 52** evidencia que o irinotecano induziu significativa diarreia ($P<0,05$) em camundongos selvagens (2 [1-3]) e TLR9^{-/-} (2 [0-3]) quando comparado ao grupo salina (0[0-0]). Desta forma, verificou-se que a deficiência do receptor para TLR9 não previne as alterações anteriormente descritas.

Adicionalmente, o irinotecano induziu uma significativa ($P<0,05$) leucopenia nos animais selvagens (42,6%) e animais *knockout* para TLR9 (50,2%) quando comparado com os controles injetados apenas com salina (**Figura 53**). O efeito pró-inflamatório do IRI (75 mg/kg, i.p.) sobre o jejuno (**Figura 54A**) e íleo (**Figura 54B**) foi detectado pelo aumento significativo ($P<0,05$) da infiltração de neutrófilos através da determinação da atividade de MPO em animais selvagens quando comparados com o controle salina WT. Esse efeito não foram aobservados nos animais TLR9^{-/-}

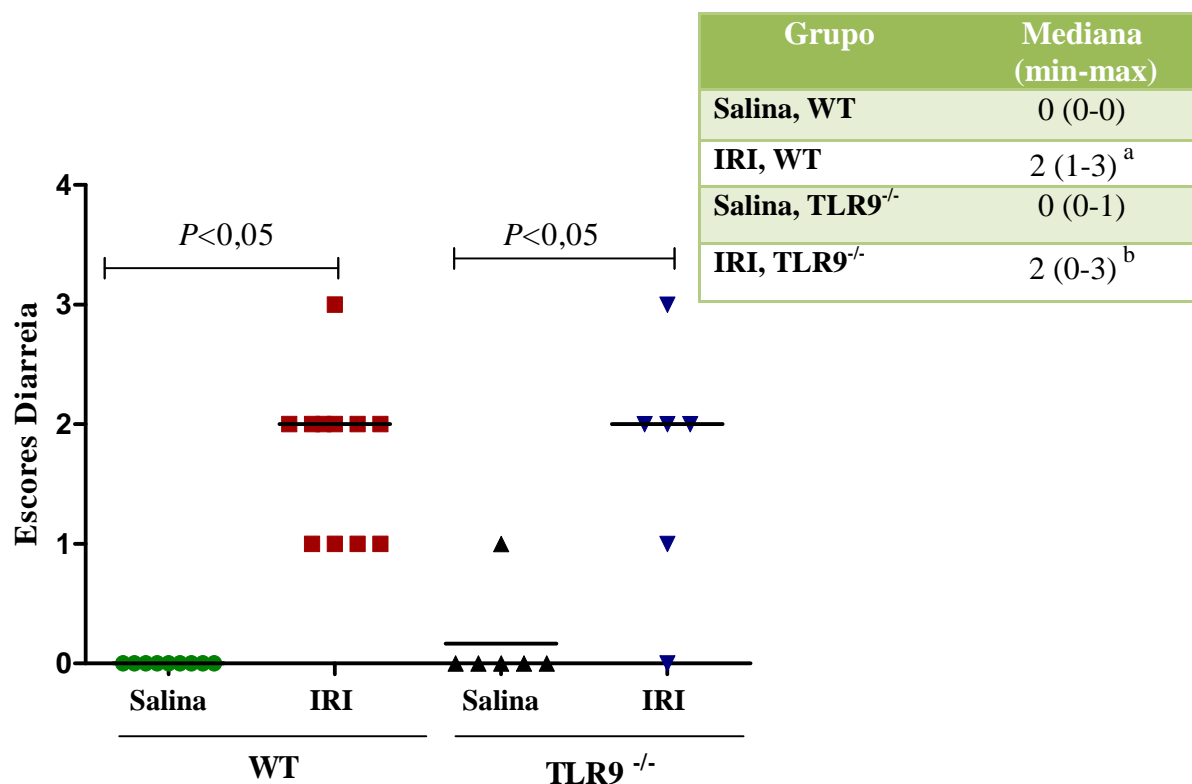
Na avaliação microbiológica, a **Figura 55A** ilustra uma importante bacteremia ($P<0,05$) após a indução da mucosite pelo irinotecano em animais selvagens. Adicionalmente, a **Figura 55B** mostra o aumento de bactérias no fígado em animais WT injetados com IRI, versus o grupo salina. Além disso, animais deficientes do receptor TLR9 apresentaram crescimento não significativo ($P>0,05$) de bactérias no sangue e no fígado após a injeção de irinotecano, quando comparado com o controle *knockout* salina.

FIGURA 51 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso de camundongos TLR9^{-/-} em função do tempo



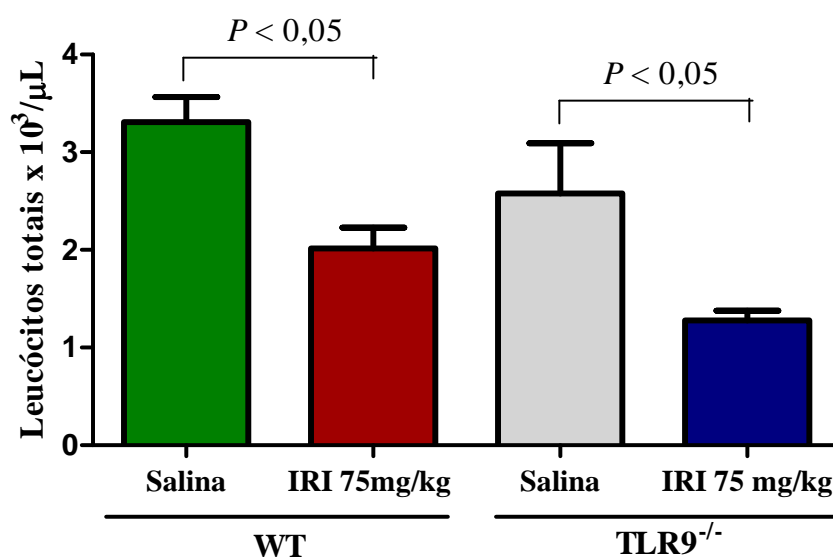
Os animais selvagens (WT) e *knockout* para TLR9 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. Os camundongos foram pesados diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam a média \pm EPM (Erro padrão da média) do percentual de variação do peso comparado ao peso inicial. ^a $P < 0,05$ vs salina WT. ^b $P < 0,05$ vs salina TLR9^{-/-}. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 52 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia de camundongos TLR9^{-/-}



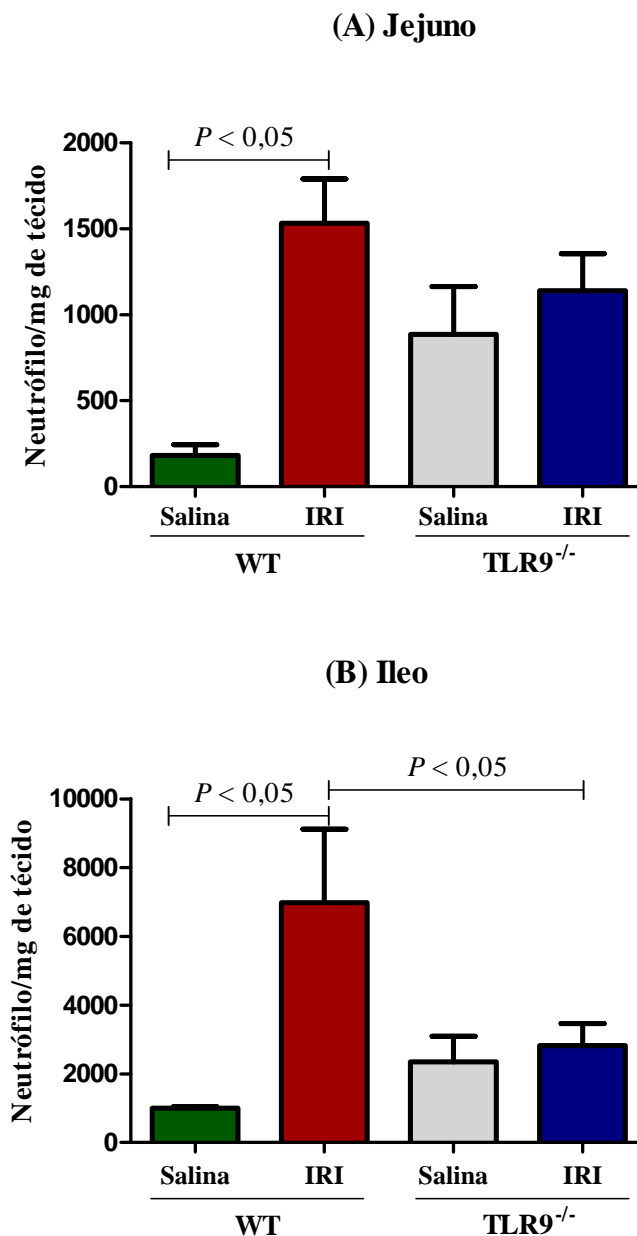
Os animais selvagens e TLR9^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e avaliados a diarreia através de escores no sétimo dia experimental. Os valores representam a mediana e variação de escores de diarreia. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina, WT. ^b $P < 0,05$ vs salina TLR9^{-/-}. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 53 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos TLR9^{-/-}



Os animais selvagens e TLR9^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sétimo dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital e realizou-se a contagem dos leucócitos totais no contador automático de células - Coulter. Os valores representam a média ± E.P.M do numero de leucócitos totais x 10³/μL. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 54 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmentos intestinais de camundongos TLR9^{-/-}



Os animais WT e TLR9^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sexto dia experimental. Amostras de jejuno e íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O gráfico mostra o efeito do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos no jejuno (A) e íleo (B) de camundongos TLR9^{-/-}. Os valores representam a média ± E.P.M do número de neutrófilos por mg. de tecido. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

4.4.5 Avaliação da participação do receptor NOD1 na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano

Na **Figura 56** observa-se que o irinotecano causou uma significativa ($P<0,05$) perda ponderal de forma tempo dependente, tanto em camundongos WT, como em animais *knockout* para NOD1 (NOD1^{-/-}) quando comparado aos respectivos controles injetados somente com salina. Adicionalmente, como ilustra a **Figura 57** verificou-se que o irinotecano induziu significativa diarreia ($P<0,05$) em camundongos selvagens (2[1-3]) quando comparado ao grupo salina WT (0[0-0]). Contudo, a **Figura 57** apresenta também que animais deficientes do receptor NOD1 injetados irinotecano não apresentam ($P<0,05$) quadros de diarreia (0 [0-1]) quando comparado com os animais WT que receberam IRI (2[1-3]).

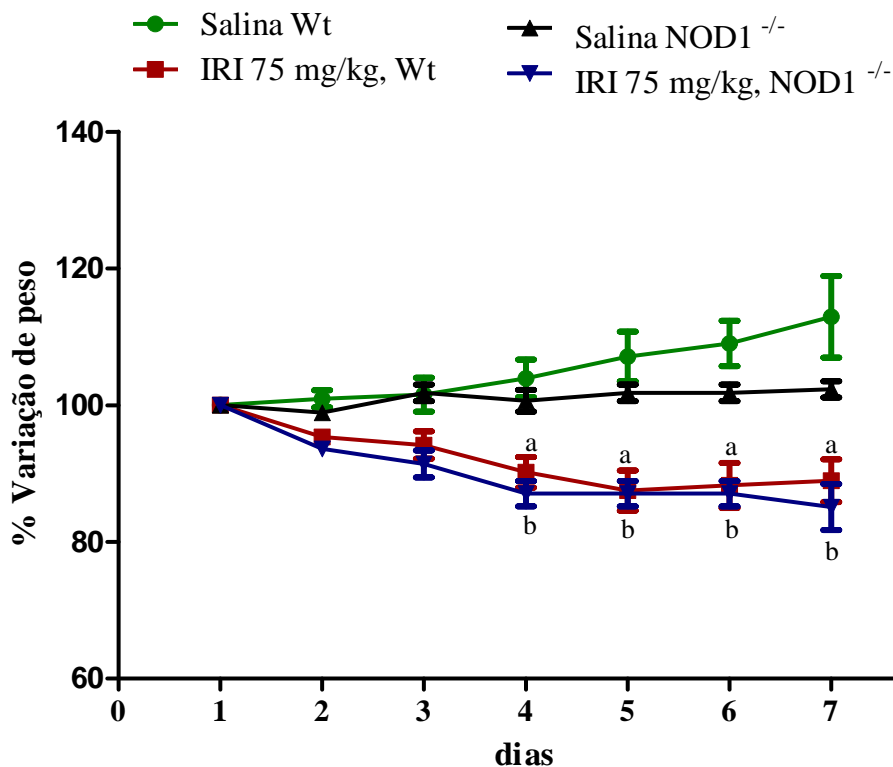
A análise morfométrica (**Figura 58**) revelou que animais selvagens (WT) injetados com irinotecano (75 mg/kg, i.p.) apresentaram uma significativa redução ($P<0,05$) na altura do vilos (**Figura 58A**) e razão vilos/cripta (**Figura 58C**) e aumento da profundidade das criptas (**Figura 58B**) quando comparados com animais selvagens injetados somente com salina. Entretanto, verificou-se que camundongos NOD1^{-/-} apresentaram um aumento significativo da altura do vilos e razão vilos/cripta quando comparados com animais WT que receberam IRI (**Figura 58**). As fotomicrografias do jejuno (**Figura 59**) e íleo (**Figura 60**) indicam que o irinotecano induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilos e infiltração inflamatória na mucosa, com perda significativa da continuidade do epitélio de revestimento em comparação com animais WT (C57BL/6) injetados apenas com salina. Adicionalmente, em animais NOD1^{-/-}, aos quais foi administrado irinotecano, observou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos camundongos WT injetados com irinotecano.

Na **Figura 61** observa-se que o irinotecano induziu uma significativa ($P<0,05$) leucopenia nos animais selvagens (44%) quando comparado com o controle injetado apenas com salina. Entretanto, camundongos NOD1^{-/-} não apresentaram ($P<0,05$) leucopenia relacionada ao tratamento com irinotecano. O efeito pró-inflamatório do IRI (75 mg/kg, i.p.) sobre o jejuno (**Figura 62A**) e íleo (**Figura 62B**) foi detectado pelo aumento significativo ($P<0,05$) da infiltração de neutrófilos, através da determinação da atividade de MPO, tanto em

animais selvagens como em animais NOD1^{-/-} comparados com os respectivos animais controles injetados somente com salina.

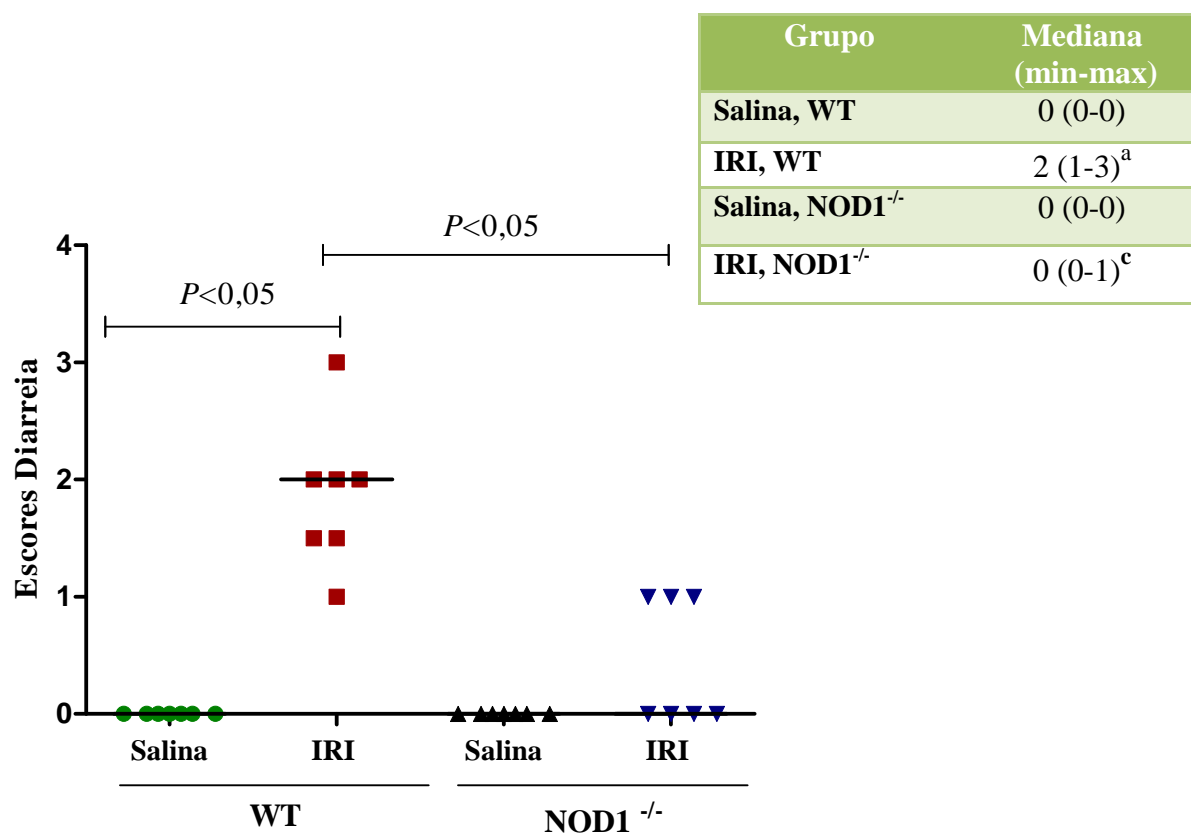
Na avaliação microbiológica, a **Figura 63A** ilustra uma importante bacteremia ($P<0,05$) após a indução da mucosite com o irinotecano em animais selvagens, quando comparado com seu respectivo controle salina. Em relação aos animais *knockout* para NOD1 injetados com irinotecano, se observou um crescimento moderado ($P=0,073$) de bactérias no sangue versus o grupo WT injetado com irinotecano. Adicionalmente, a **Figura 63B** mostra o aumento ($P<0,05$) de bactérias no fígado em animais WT injetados com IRI versus o grupo salina. Porém, animais deficientes do receptor NOD1 injetados com irinotecano não apresentaram reversão do crescimento de bactérias no fígado quando comparado com o grupo selvagem que recebeu irinotecano ($P>0,05$).

FIGURA 56 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a percentagem de variação de peso de camundongos NOD1^{-/-} em função do tempo



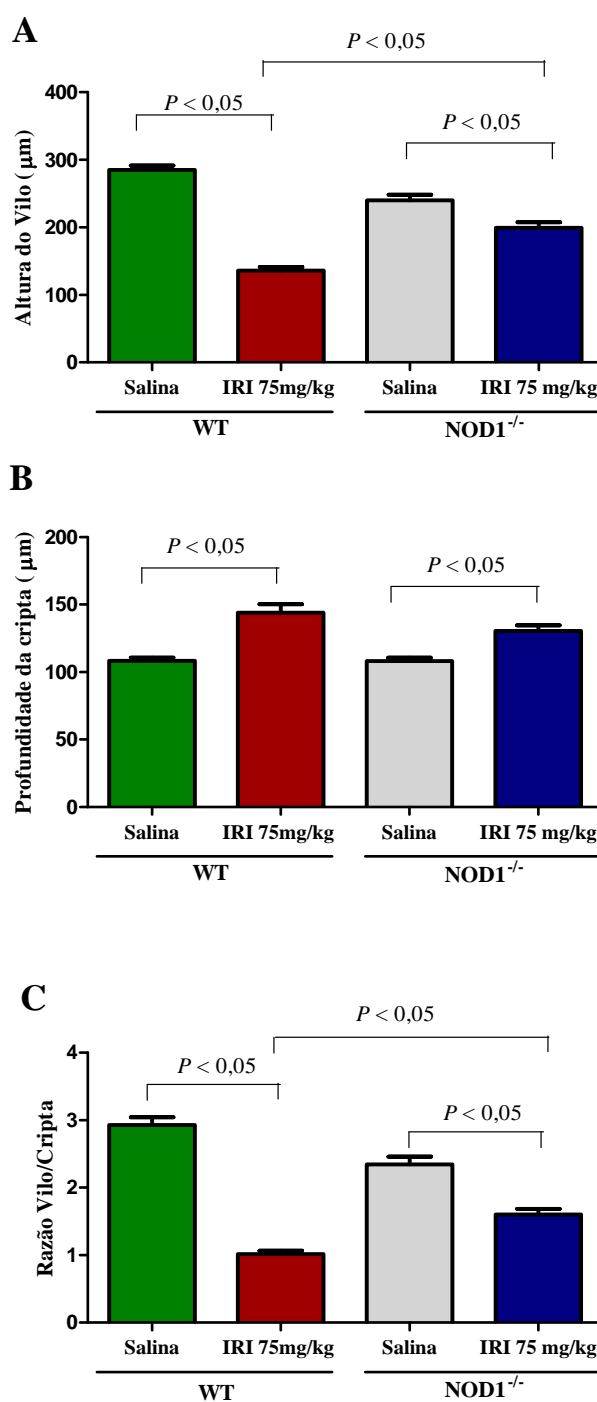
Os animais selvagens (WT) e *knockout* para NOD1 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. Os camundongos foram pesados diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam a média ± EPM (Erro padrão da média) do percentual de variação do peso comparado ao peso inicial. ^aP < 0,05 vs salina WT. ^bP < 0,05 vs salina NOD1^{-/-}. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 57 – Efeito da injeção do irinotecano sobre os escores de diarreia de camundongos NOD1^{-/-}



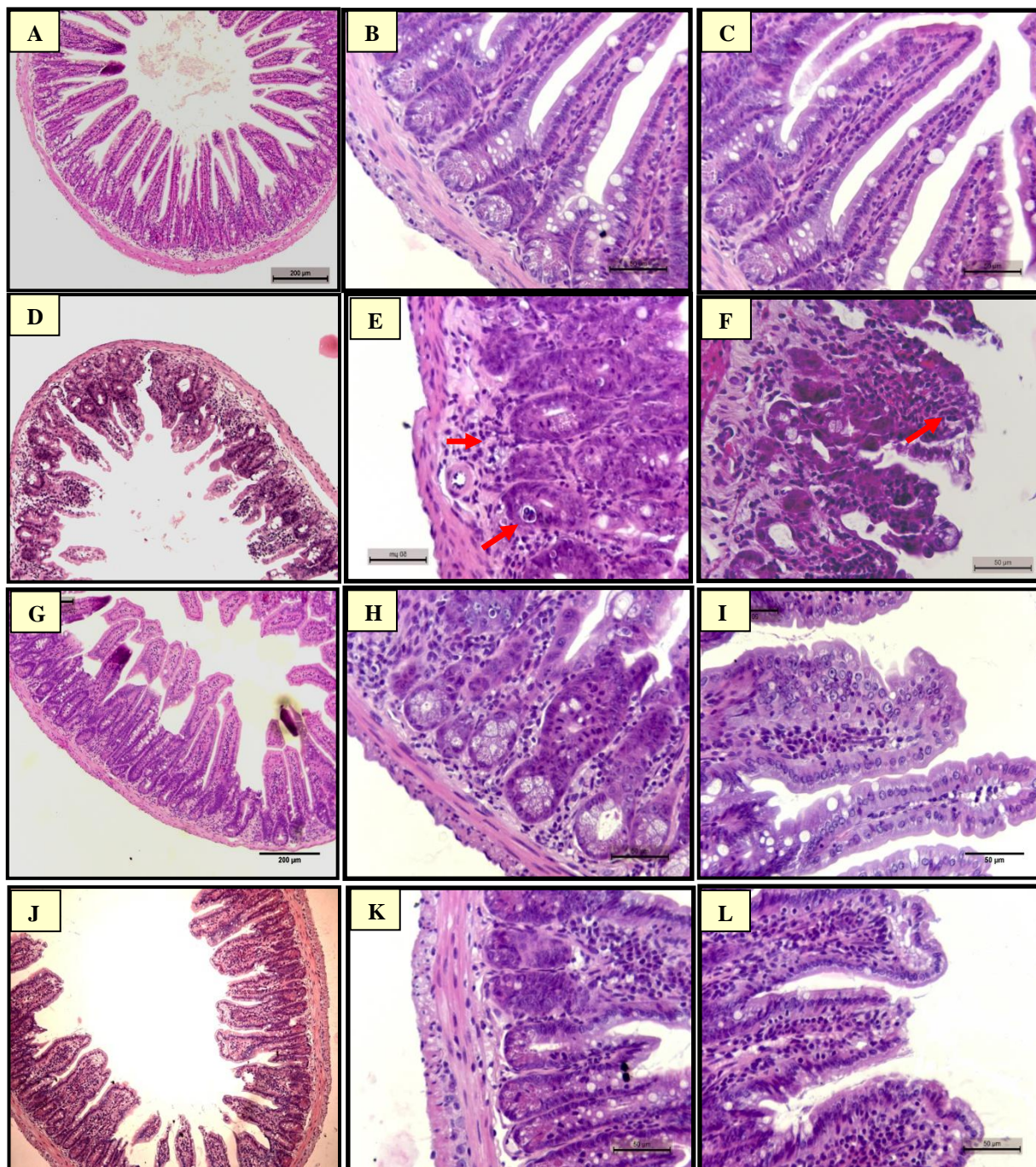
Os animais selvagens (WT) e *knockout* para NOD1 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e avaliados a diarreia através de escores no sétimo dia experimental. Os valores representam a mediana e a variação dos escores de diarreia. ^a $P < 0,05$ vs grupo salina, WT. ^c $P < 0,05$ vs grupo Irinotecano, WT. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

FIGURA 58 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a análise morfométrica de camundongos $NOD1^{-/-}$



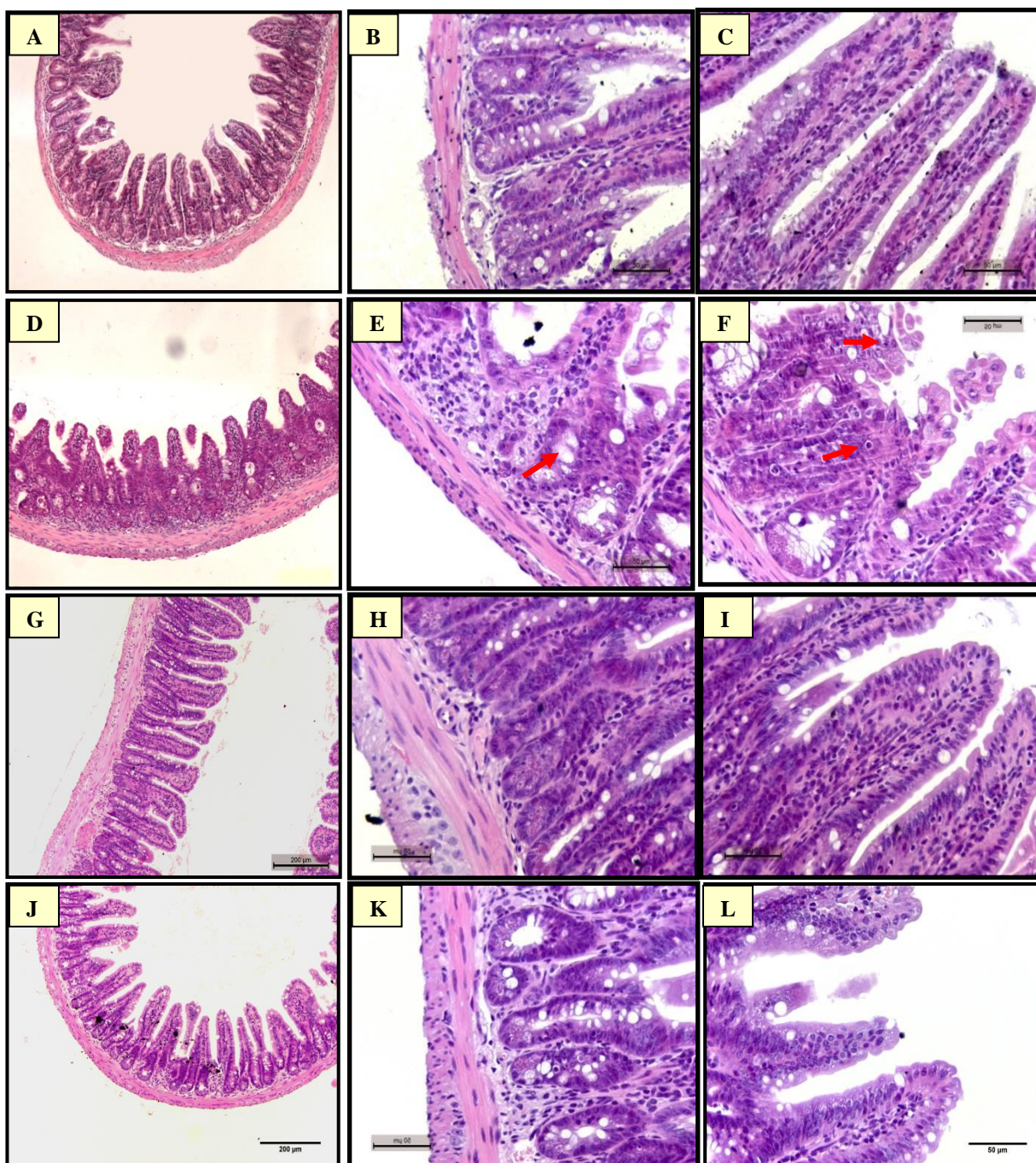
Os animais selvagens (WT) e *knockout* para NOD1 receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. Segmentos de jejuno foram obtidos para a mensuração da altura dos vilos (A), profundidade da cripta (B) e razão vilo/cripta (C). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. $P < 0,05$. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 59 – Fotomicrografias de amostras de jejuno de camundongos NOD1^{-/-} após a injeção de irinotecano



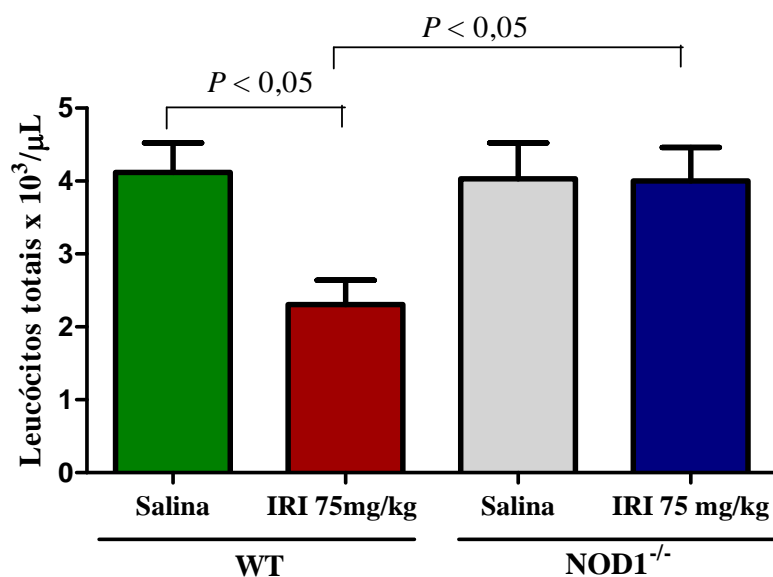
Os animais WT e NOD1^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de jejuno foram removidos e processados para a técnica de coloração H&E para posterior análise histopatológica. Na mucosa dos animais WT que receberam IRI, os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas. Nos animais NOD1^{-/-} há maior preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** salina WT, 100x; **Painel B-C:** salina WT, 400x (cripta-vilo). **Painel D:** IRI WT, 100x; **Painel E-F:** IRI WT, 400x (cripta-vilo). **Painel G:** salina NOD1^{-/-}, 100x; **Painel H-I:** salina NOD1^{-/-}, 400x (cripta-vilo). **Painel J:** IRI NOD1^{-/-}, 100x; **Painel K-L:** IRI NOD1^{-/-}, 400x (cripta-vilo).

FIGURA 60 – Fotomicrografias de amostras de íleo de camundongos NOD1^{-/-} após a injeção de irinotecano



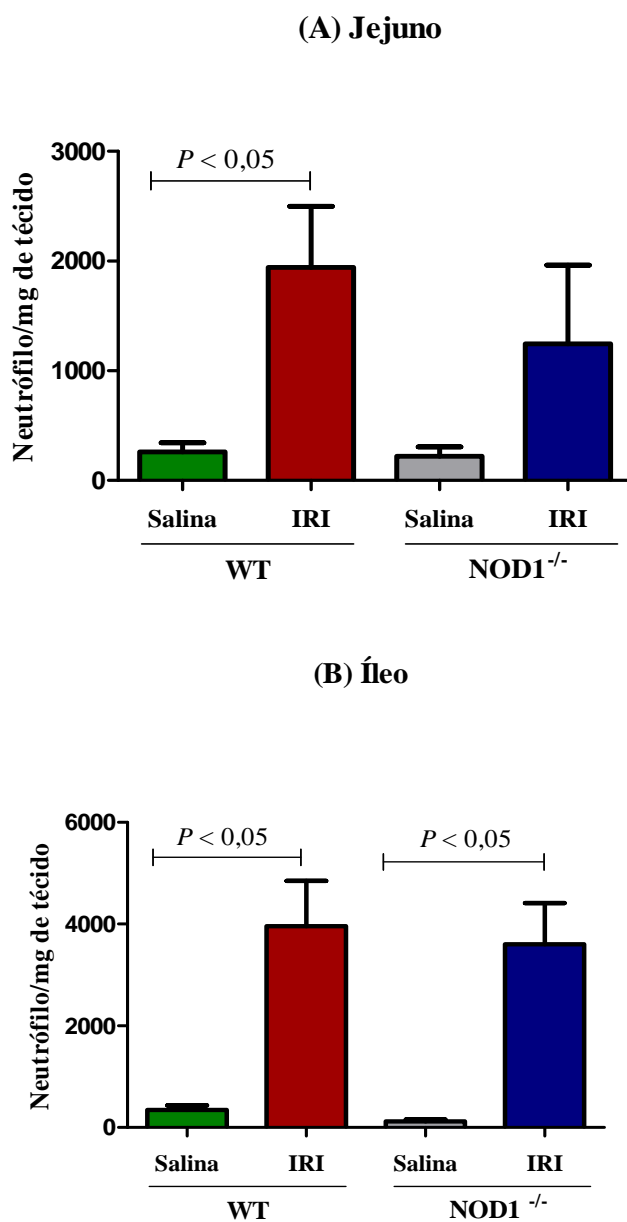
Os animais WT e NOD1^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração H&E para posterior análise histopatológica. Na mucosa dos animais WT que receberam IRI, os vilos estão encurtados, há achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas. Nos animais NOD1^{-/-} há maior preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** salina WT, 100x; **Painel B-C:** salina WT, 400x (cripta-vilo). **Painel D:** IRI WT, 100x; **Painel E-F:** IRI WT, 400x (cripta-vilo). **Painel G:** salina NOD1^{-/-}, 100x; **Painel H-I:** salina NOD1^{-/-}, 400x (cripta-vilo). **Painel J:** IRI NOD1^{-/-}, 100x; **Painel K-L:** IRI NOD1^{-/-}, 400x (cripta-vilo).

FIGURA 61 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos $NOD1^{-/-}$



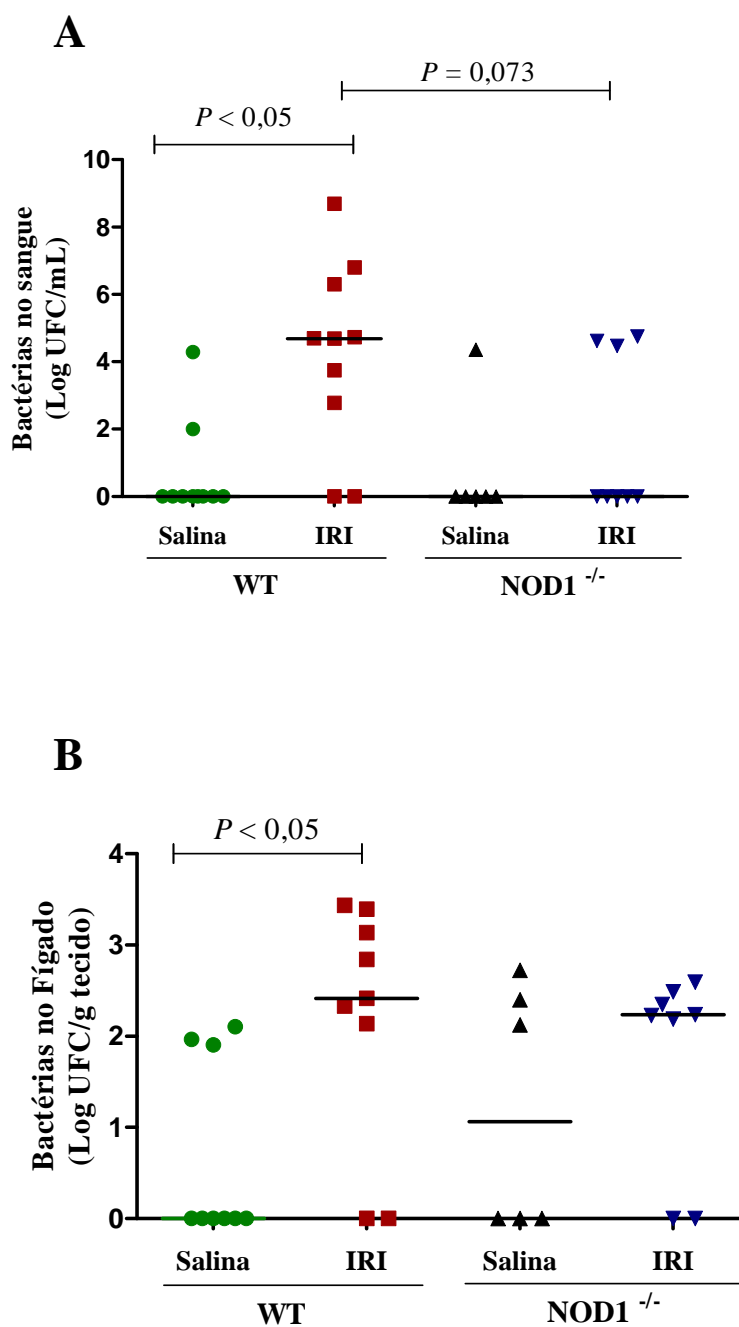
Os animais selvagens e $NOD1^{-/-}$ receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sétimo dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retroorbital e realizou-se a contagem dos leucócitos totais no contador automático de células - Coulter. Os valores representam a média \pm E.P.M do número de leucócitos totais x 10³/µL. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 62 – Efeito da injeção do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos em segmento de jejuno e íleo de camundongos NOD^{-/-}



Os animais WT e NOD1^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias e sacrificados no sétimo dia experimental. Amostras de jejuno e íleo foram coletadas para a determinação do infiltrado de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O gráfico mostra o efeito do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos no jejuno (A) e íleo (B) de camundongos NOD1^{-/-}. Os valores representam a média ± E.P.M do número de neutrófilos por mg. de tecido. $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

FIGURA 63 - Efeito da injeção do irinotecano sobre a contagem de bactérias no sangue e fígado de camundongos NOD1^{-/-}



Os animais WT e NOD1^{-/-} receberam salina (5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. O número de bactérias no sangue e fígado foi avaliado após sete dias da indução da mucosite nos camundongos WT e NOD1^{-/-}. O número total de bactérias foi estimado pelo cultivo das amostras em placas contendo meio Mueller-Hinton por 48 h de incubação na estufa bacteriológica. Os resultados foram expressos como Log do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de sangue (**A**) e como Log UFC por g. de tecido (**B**). $P < 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn

4.5. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS *IN VIVO* DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38

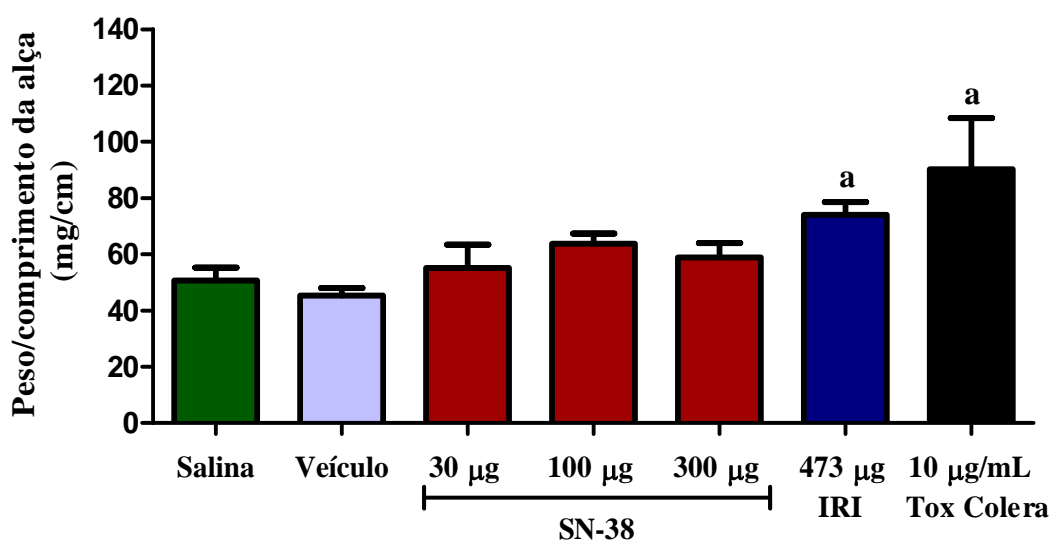
Observou-se que a injeção local de SN-38 não causou um aumento significativo ($P>0,05$) na relação do peso/comprimento da alça ligada (**Figura 64**) em comparação ao grupo salina. Contudo, a toxina da cólera, a qual foi utilizada como controle positivo experimental, e o irinotecano aumentaram significativamente ($P<0,05$) esta relação ($90,29 \pm 18,18$ e $74,08 \pm 4,54$, respectivamente) quando comparado ao grupo salina ($50,75 \pm 4,47$).

Ao se avaliar a secreção intestinal, verificou-se que o SN-38 não foi capaz de induzir secreção apreciável versus o grupo salina ($P>0,05$). Contudo, a toxina da cólera e o irinotecano induziram um significativo aumento ($P<0,05$) da secreção intestinal ($39,88 \pm 13,45$ e $10,34 \pm 4,7$, respectivamente) quando comparado ao grupo salina ($0,00 \pm 0,00$). (**Figura 65**).

A **Figura 66** apresenta os achados histopatológicos de animais que receberam injeções locais de salina, de SN-38 ou de irinotecano. Os resultados evidenciaram que o SN-38 causou uma leve alteração na arquitetura celular de vilos. A análise morfométrica, observada na **Figura 67**, confirmou esse achado visto que houve uma redução ($P<0,05$) tanto da altura dos vilos como da razão vilo/cripta nos grupos SN-38 e irinotecano quando comparado ao grupo salina.

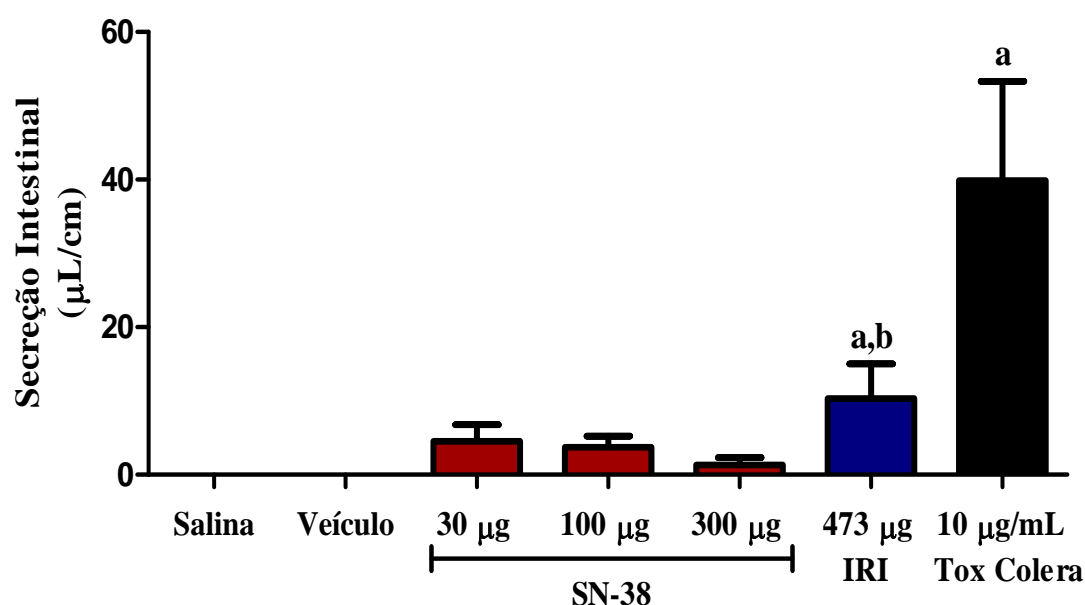
Com relação à atividade da mieloperoxidase, observou-se, também, que o SN-38 na concentração de 100 e 300 μg aumentou significativamente ($P<0,05$) este parâmetro no jejuno ($4,24 \pm 0,69$ e $4,57 \pm 0,88$, respectivamente), quando comparado ao grupo salina ($2,09 \pm 0,48$). Entretanto, a toxina da cólera não induziu aumento significativo de MPO no intestino ($P<0,05$) versus o grupo salina (**Figura 68**).

FIGURA 64 – Efeito da injeção local do SN-38 sobre a relação peso/comprimento de alça intestinal isolada



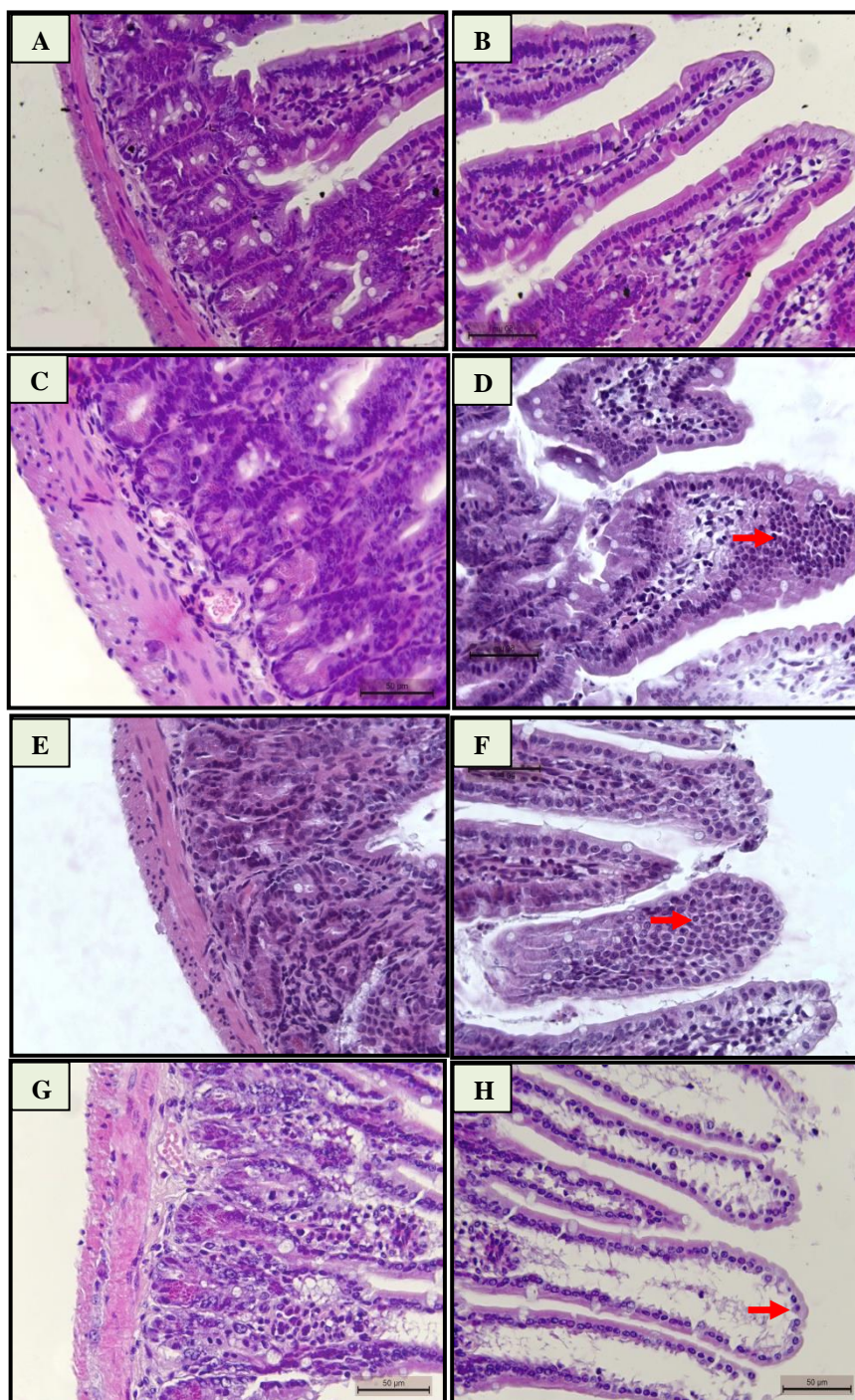
Animais previamente anestesiados com ketamina (35 mg/kg, i.m) e xilazina (10 mg/kg, i.m) receberam uma injeção local dentro da alça de salina (200 µL/alça), veículo (DMSO 2%, 200 µL/alça), SN-38 (30, 100 ou 300 µg /alça), irinotecano (IRI, 473 µg /alça) ou toxina da cólera (10 µg/mL, 200 µL/alça. controle positivo). Após 3 horas, os animais foram sacrificados, as alças foram coletadas, pesadas e tiveram o comprimento medido. Observou-se que a injeção local de SN-38 não causou um aumento significativo ($P > 0,05$) na relação do peso/comprimento (mg/cm) da alça isolada em nenhuma concentração testada em comparação ao grupo salina. Contudo, O irinotecano e a toxina da cólera aumentaram significativamente ($P < 0,05$) esta relação quando comparado ao grupo salina e/ou veículo. Realizou-se a análise estatística pelo método ANOVA seguido do teste de Bonferroni. ^a $P < 0,05$ vs salina e veículo.

FIGURA 65 – Efeito da injeção local do SN-38 sobre o volume secretório de alça intestinal isolada



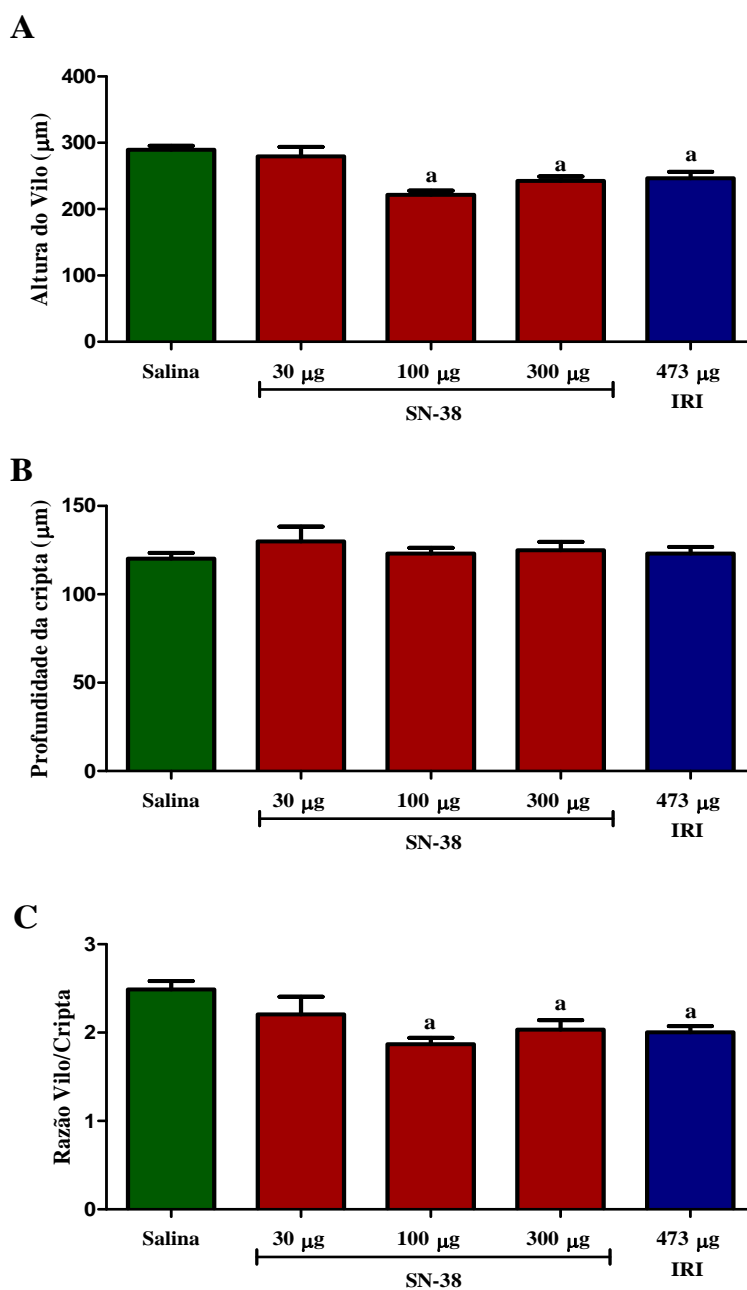
Animais previamente anestesiados com ketamina (35 mg/kg, i.m) e xilazina (10 mg/kg, i.m) receberam uma injeção local dentro da alça de salina (200 µL/alça), veículo (DMSO 2%, 200 µL/alça), SN-38 (30, 100 ou 300 µg /alça), IRI (473 µg /alça) ou toxina da cólera (10 µg/mL, 200 µL/alça. controle positivo). Após 3 horas, os animais foram sacrificados, as alças foram coletadas, e tiveram o volume de secreção e comprimento intestinais medidos. Observou-se que a injeção local de SN-38 não causou um aumento significativo ($P > 0,05$) na secreção intestinal (µL/cm) em nenhuma concentração testada em comparação ao grupo salina. Contudo, o irinotecano e a toxina da cólera aumentaram significativamente ($P < 0,05$) esta relação quando comparado ao grupo salina e/ou veículo. Realizou-se a análise estatística pelo método ANOVA seguido do teste de Bonferroni. ^a $P < 0,05$ vs salina e veículo. ^b $P < 0,05$ vs SN300 µg/alça.

FIGURA 66 – Fotomicrografias de cortes histológicos de alça intestinal isolada após a injeção local de SN38



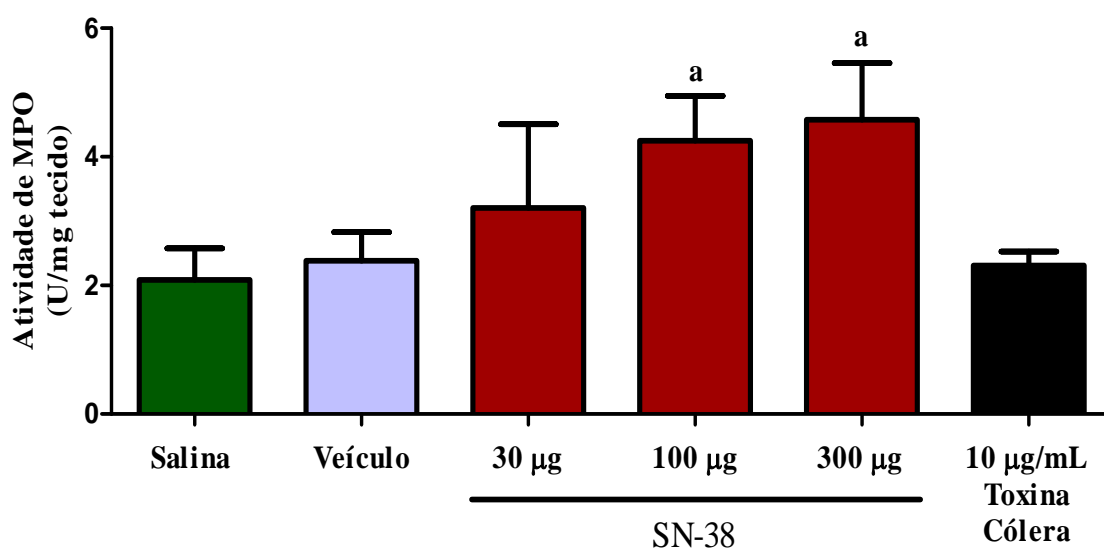
Animais previamente anestesiados com ketamina (35 mg/kg, i.m) e xilazina (10 mg/kg, i.m) receberam uma injeção dentro da alça isolada 200 µL de salina, SN-38 (100 ou 300 µg /alça) ou irinotecano (IRI 473 µg/alça). Após 3 horas, sacrificaram-se os animais e as alças foram coletadas e processadas para a técnica de coloração pelo método H&E (400x) para posterior análise histopatológica. **Painel A-B:** salina (cripta-vilo). **Painel C-D:** SN38, 100 µg /alça (cripta-vilo). **Painel E-F:** SN38, 300 µg /alça (cripta-vilo). **Painel G-H:** irinotecano, 473 µg/alça (cripta-vilo).

FIGURA 67 – Efeito da injeção local do SN-38 sobre a análise morfológica de alça intestinal isolada



Animais previamente anestesiados com ketamina (35 mg/kg, i.m) e xilazina (10 mg/kg, i.m) receberam uma injeção dentro da alça isolada 200 µL de Salina, SN-38 (30, 100 ou 300 µg /alça) ou irinotecano (IRI 473 µg/alça). Após 3 horas, sacrificaram-se os animais e as alças foram coletadas para análise morfológica tais como mensuração da altura dos vilos (A), profundidade das criptas (B) e razão vilo/cripta (C). Observou-se que a injeção local de SN-38 na dose de 100 µg/alça reduziu significativamente ($P < 0,05$) a altura dos vilos e a profundidade das criptas em alças isoladas quando comparado ao grupo salina. Os dados foram expressos em termos de Média ± EPM. Realizou-se a análise estatística pelo método ANOVA seguido do teste de Bonferroni. ^a $P < 0,05$ vs salina.

FIGURA 68 – Efeito da injeção local do SN-38 sobre a atividade de MPO em alça intestinal isolada



Animais previamente anestesiados com ketamina (35 mg/kg, i.m) e xilazina (10 mg/kg, i.m) receberam uma injeção dentro da alça 200 µL de salina, veículo (DMSO 2%), SN-38 (30, 100 ou 300 µg /alça) ou toxina da cólera (10 µg/mL). Após 3 horas, sacrificaram-se os animais e as alças foram coletadas para determinação da atividade de mieloperoxidase. Observou-se que a injeção local de SN-38 nas doses de 100 e 300 µg/alça aumentaram significativamente ($P < 0,05$) a atividade de mieloperoxidase em alça isolada quando comparado ao grupo salina. Contudo, a toxina colérica não alterou a atividade desta enzima ($P > 0,05$) quando comparada ao grupo salina. Os dados foram expressos em termos de Média \pm EPM. Realizou-se a análise estatística pelo método ANOVA seguido do teste de Bonferroni. ^a $P < 0,05$ vs salina e veículo.

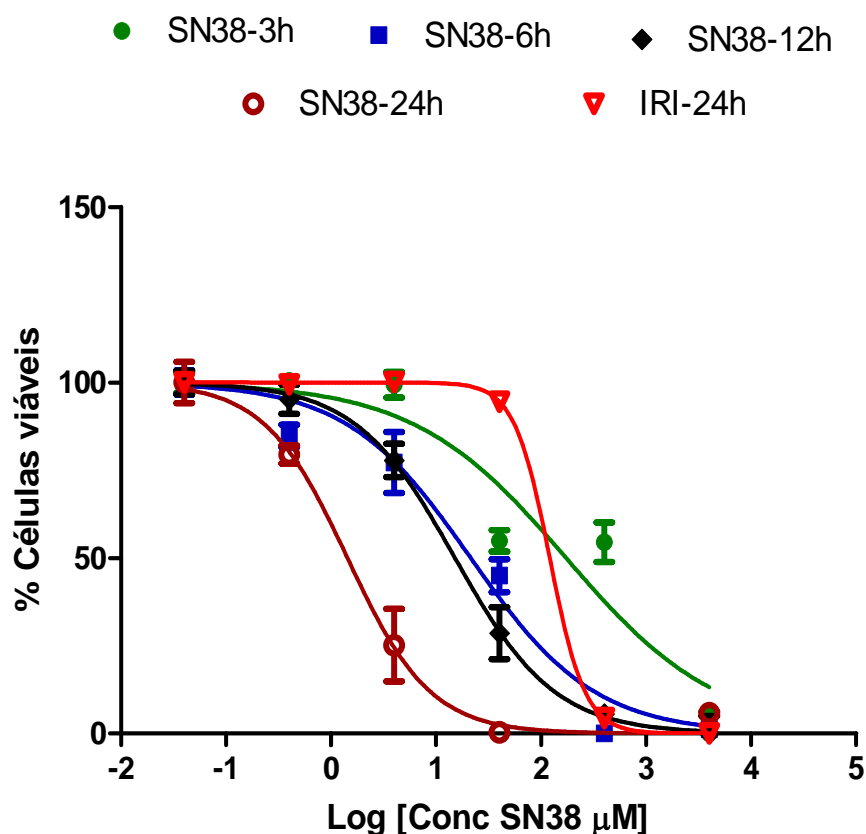
4.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS *IN VITRO* DO METABÓLITO ATIVO DO IRINOTECANO, O SN38

Os experimentos *in vitro* foram realizados em células intestinais de rato (IEC-6) para avaliar os efeitos do metabólito ativo do Irinotecano, o SN38 nas alterações morfológicas nessa linhagem celular.

A atividade citotóxica do SN38 e irinotecano foi avaliada pelo método do MTT e os resultados estão representados na **Figura 69**. O SN38 mostrou uma atividade citotóxica, com IC_{50} de 1,43 μ M após 24 horas de incubação. Porém, o irinotecano evidenciou um IC_{50} de 120,8 μ M.

No ensaio de viabilidade celular através do teste de exclusão por azul de tripan, observou-se que a incubação de SN38 (4, 40 e 400 μ M) nas células IEC-6 após 12 e 24 horas de incubação, reduziu a viabilidade celular ($P<0,05$) de forma concentração dependente, quando comparado ao grupo controle negativo. Adicionalmente, a pró-droga irinotecano (400 μ M) e a doxorrubicina (0,5 μ M, controle positivo) reduziram ($P<0,05$) a viabilidade celular (**Figura 70**). Esses achados foram corroborados na contagem do número de células apresentada na **Figura 72**, evidenciou-se que a incubação do SN38 diminuiu significativamente ($P<0,05$) o número de células após 3, 6, 12 e 24 horas, versus o grupo controle negativo. A **Figura 73** ilustra que o SN38 induz um aumento significativo ($P<0,05$) na porcentagem de células picnóticas, indicadoras de morte celular, após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação, quando comparado ao grupo controle negativo. Adicionalmente, a **Figura 71** mostra as alterações morfológicas do metabólito ativo do irinotecano nas células intestinais de rato (IEC-6) após 3, 6, 12 e 24 de incubação.

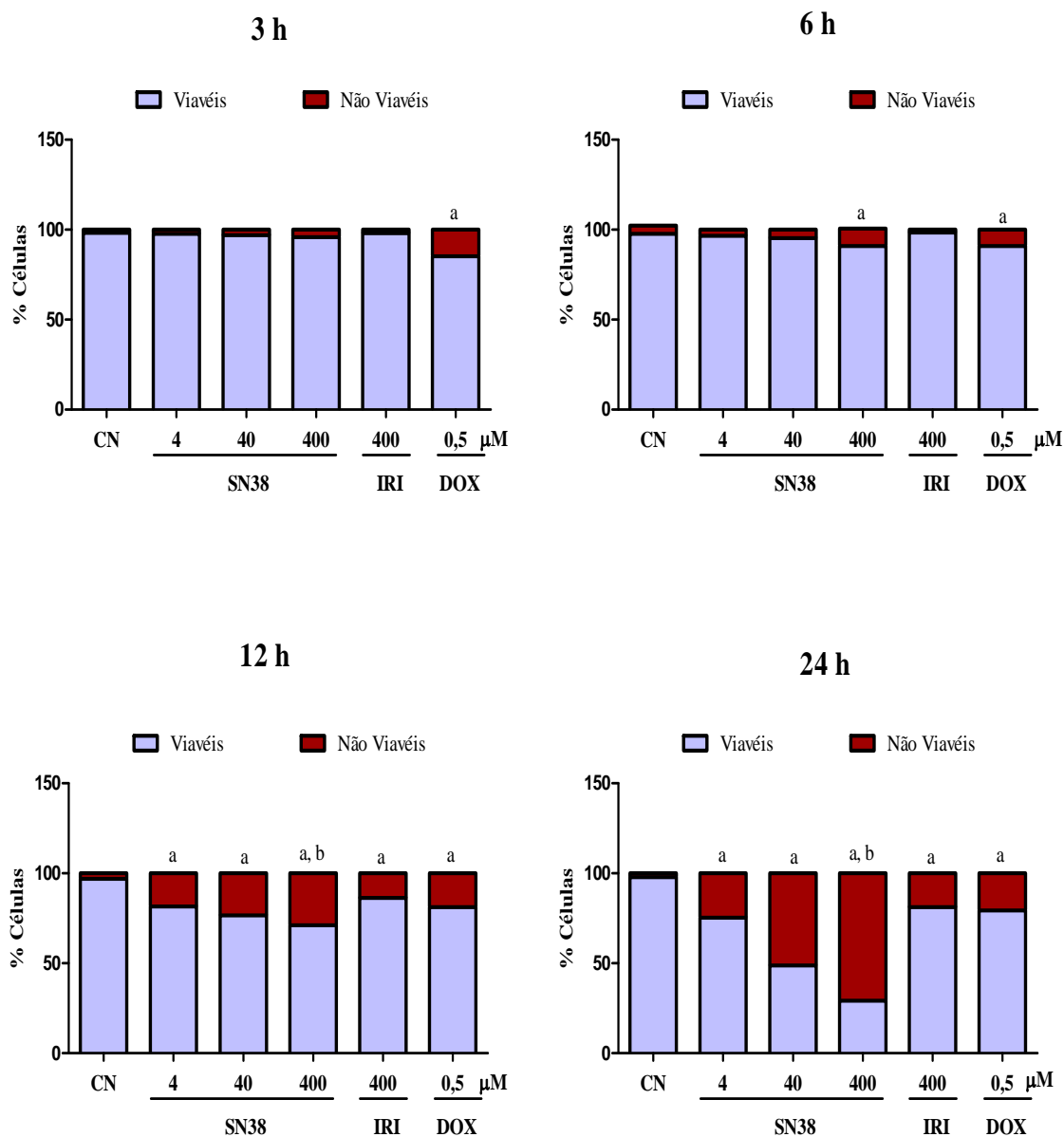
FIGURA 69 – Efeito do SN-38 sobre a citotoxicidade *in vitro* em células IEC-6 determinado pelo método do MTT



SN38 (μM)	3 h	6 h	12 h	24 h	IRI-24h
IC₅₀	172,8	21,38	15,14	1,43	120,8
IC 95%	76,9 –388,3	13,2-34,4	10,6-21,5	0,9 –2,1	108,8-134,2

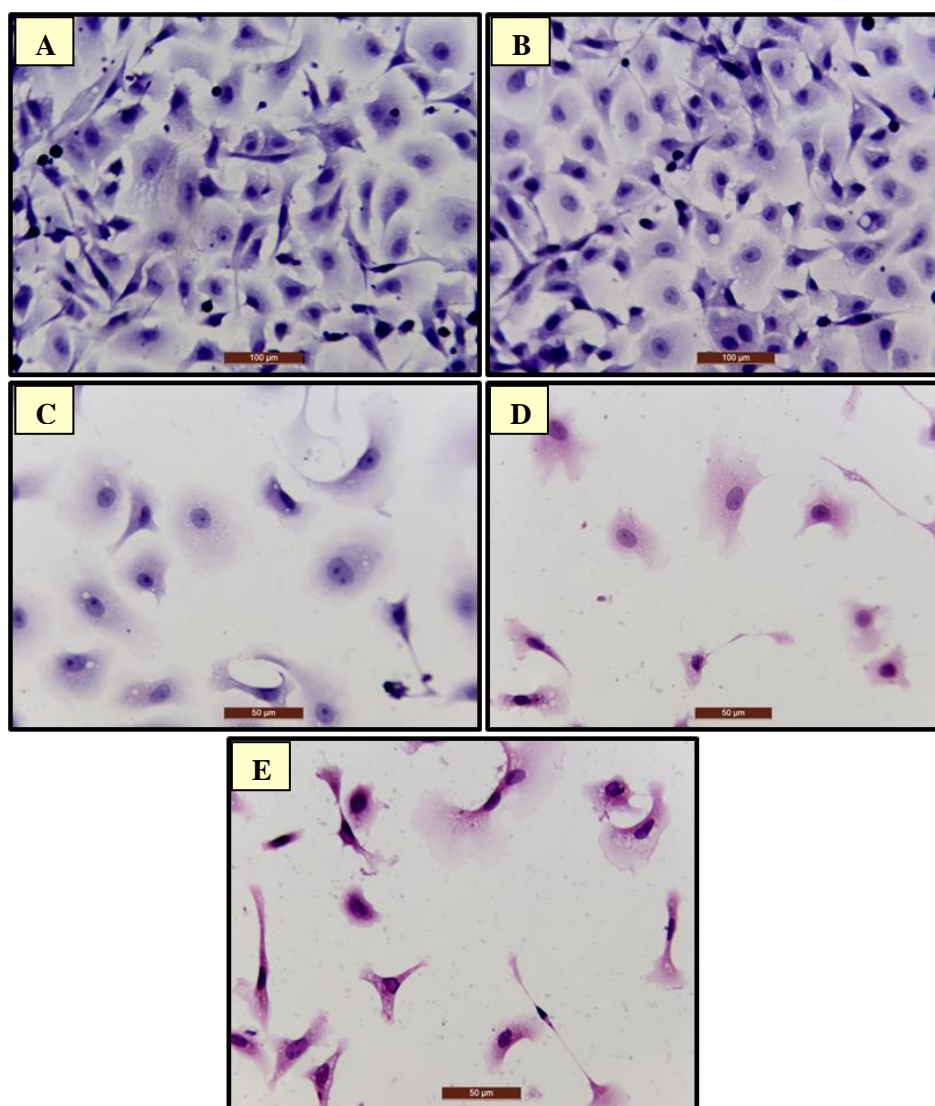
A atividade citotóxica do SN38 foi avaliada pelo método do MTT. As células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/mL). Em seguida, as células IEC-6 foram incubadas com DMSO 0,4% (veículo), SN38 (0,04 a 4000 μM) e irinotecano (0,04 a 4000 μM) durante 3, 6, 12 e 24 horas. Logo as células foram incubadas com solução de MTT 10% por 3h e lidas no comprimento de 570 nm. Os dados foram apresentados como valor das médias \pm E.P.M (n=4). Os valores de IC₅₀ (concentração inibitória capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram determinados através de uma curva concentração-resposta sigmoidal não linear.

FIGURA 70 – Efeito do SN38 sobre a viabilidade celular em células IEC-6 determinado pelo teste de exclusão de azul de tripan após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação



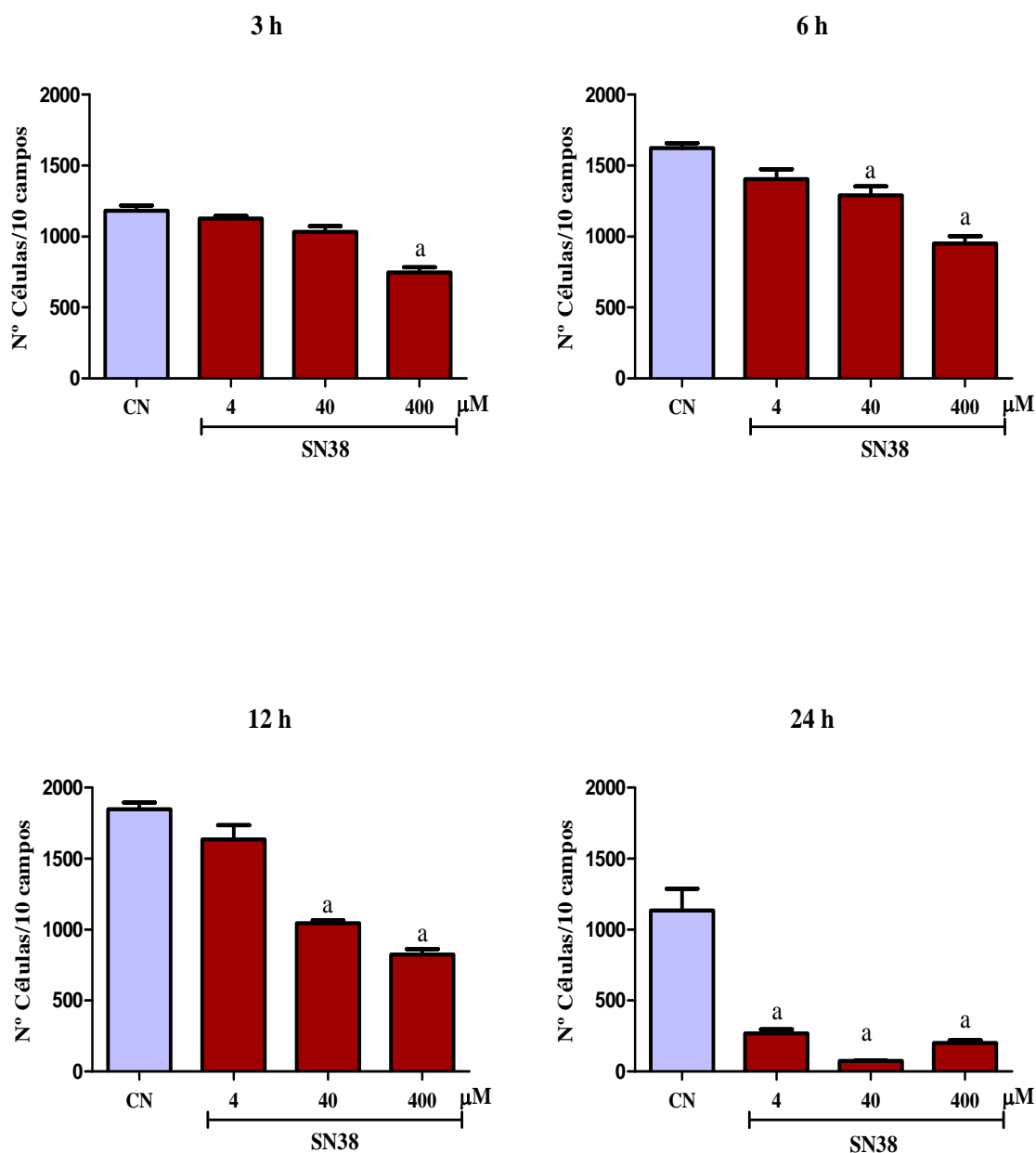
A figura mostra a determinação da viabilidade celular analisada pelo ensaio de exclusão de azul de tripan. As células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 96 poços (2×10^5 células/mL) e em seguida as células IEC-6 foram incubadas com SN38 (4, 40 e 400 μ M) e irinotecano (400 μ M, IRI) durante 3, 6, 12 e 24 h. O controle negativo (CN) foi incubado com o veículo DMSO 0,4%. Doxorrubicina (0,5 μ M) foi usada como controle positivo (DOX). Os dados foram apresentados como valor das médias \pm EPM (n=6). ^a $P < 0,001$ quando comparado ao controle negativo; ^b $P < 0,001$ vs irinotecano. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni

FIGURA 71 – Fotomicrografias de células intestinais de rato (IEC-6) após 24 h de incubação com SN38



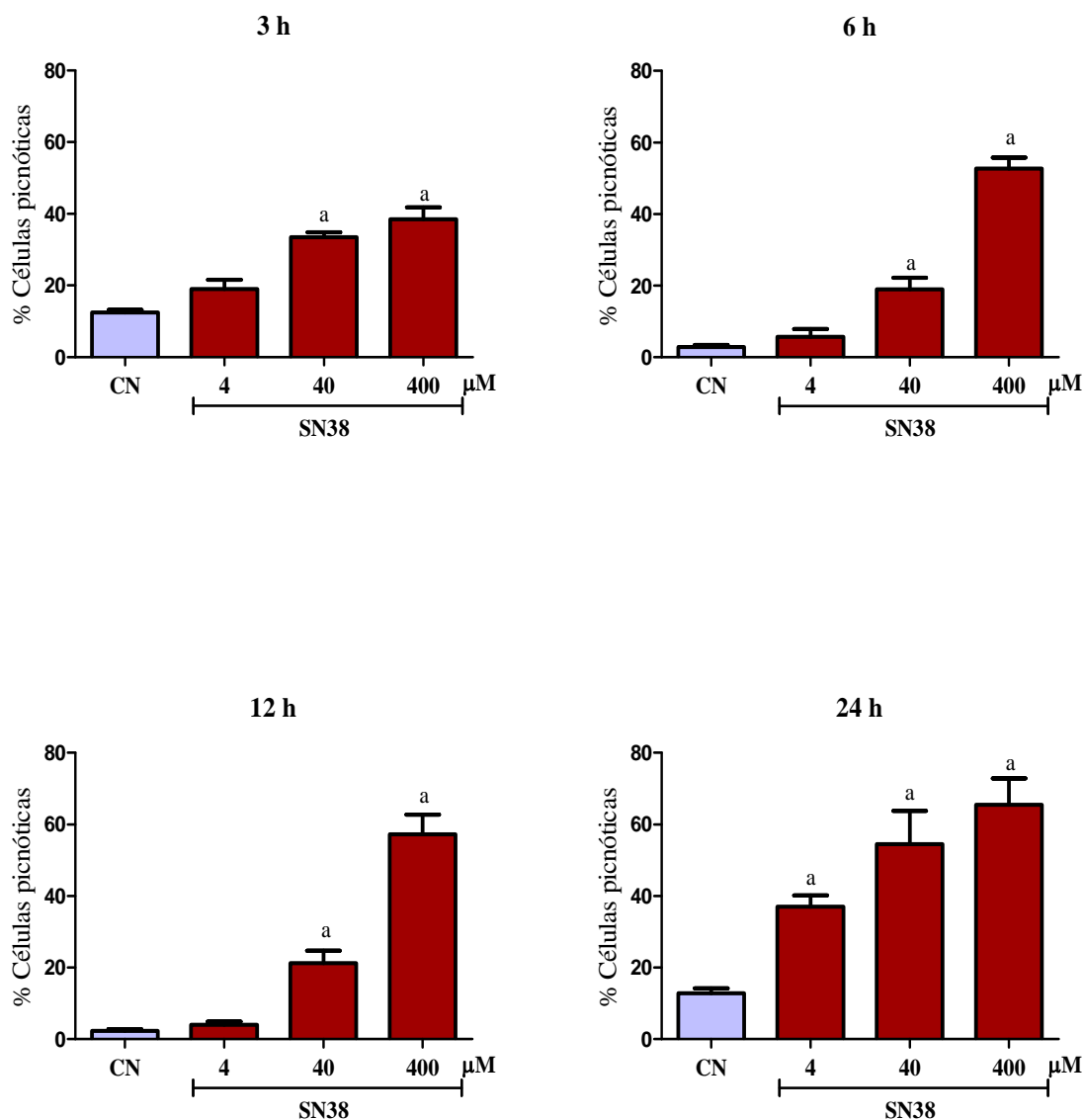
As células IEC-6 foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 células/mL até atingir a confluência. Em seguida, as células foram incubadas com SN38 na concentração de 4, 40 e 400 µM ou veículo (DMSO 0,4%) durante 3, 6, 12 e 24 horas e em seguida coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) e observadas ao microscópio óptico (400x). **Painel A:** Controle negativo, **Painel B:** veículo, **Painel C:** SN38, 4µM. **Painel D:** SN38, 40µM. **Painel E:** SN38, 400µM.

FIGURA 72 – Efeito do SN38 sobre a contagem do número de células IEC-6 após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação



As células IEC-6 foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 células/mL até atingir a confluência. Em seguida, as células foram incubadas com SN38 na concentração de 4, 40 e 400 μM ou veículo (DMSO 0,4%, controle negativo) durante 3, 6, 12 e 24 horas e em seguida coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) e observadas ao microscópio óptico (100x) para a contagem do número de células por 10 campos. Os dados foram apresentados como valor das médias \pm EPM (n=6). ^a $P < 0,001$ quando comparado ao controle negativo. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni

FIGURA 73 – Efeito do SN38 sobre a percentagem de células picnóticas após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação



As células IEC-6 foram tripsinizadas e semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 células/mL até atingir a confluência. Em seguida, as células foram incubadas com SN38 na concentração de 4, 40 e 400 μM ou veículo (DMSO 0,4%, controle negativo) durante 3, 6, 12 e 24 horas e em seguida coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) e observadas ao microscópio óptico (100x) para a contagem de células picnóticas. Os dados foram apresentados como valor das médias \pm EPM (n=6). ^a $P < 0,001$ quando comparado ao controle negativo. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho verificou-se que o irinotecano foi 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. Verificou-se, também, a presença de translocação bacteriana para órgãos periféricos como, por exemplo, o fígado, no curso da lesão intestinal induzida pelo irinotecano. Ao que se observou no estudo, a deficiência de receptores Toll-like do tipo 2, assim como da proteína adaptadora MyD88 envolvida na sinalização de receptores Toll, previniu o desenvolvimento do dano intestinal e da diarreia. Contudo, a deficiência dos receptores NOD1 somente melhorou a diarreia, sem atenuar a inflamação induzida pelo irinotecano. Adicionalmente, os dados deste trabalho mostraram a presença do infiltrado neutrofilico intestinal causado pelo efeito direto do metabólito do irinotecano, SN38, no modelo de alça isolada, o que pode reforçar a ideia de que o SN-38 possa, além de ser o agente indutor do efeito citotóxico antitumoral, ser também, o indutor das alterações lesivas intestinais, muito embora não tenha provocado secreção intestinal.

No intuito de se estudar a patogênese da mucosite intestinal provocada pelo irinotecano, à busca por um modelo experimental que mimetizasse com fidedignidade as alterações observadas na prática clínica. Nesse sentido, em 2008 Melo e colaboradores no LAFICA (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer), modificaram o modelo descrito na literatura em ratos, utilizando camundongos Swiss e esquema de doses e cinética distintos. Dessa forma, as análises experimentais foram realizadas no sétimo dia após a primeira, das quatro injeções diárias de irinotecano. Lima-Júnior e colaboradores (2012), entretanto, utilizando camundongos C57BL/6 obtidos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde os experimentos foram realizados, observaram que o melhor tempo para o sacrifício dos animais seria o quinto dia experimental, a partir do qual a incidência de mortalidade dos animais aumentava demasiadamente. Considerando os resultados apresentados nesses estudos, optamos pelo sacrifício dos camundongos C57BL/6 obtidos no nosso biotério do Departamento de Farmacologia da UFC, no quinto e o sétimo dia

experimental, de modo a caracterizar as diferenças em termos fisiopatológicos da mucosite em cada momento experimental.

Melo e colaboradores (2008), haviam demonstrado que o dano de mucosa foi evidenciado por áreas intestinais desnudas, com perda da altura de vilos e de células epiteliais intestinais, vacuolização e necrose celular. Associado a esse dano estrutural, verificou-se um intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria. Os dados do presente trabalho corroboram com tais achados. Além disso, verificou-se que o irinotecano induz uma marcante perda de peso dos animais, desenvolvimento de diarreia grave, infiltração neutrofílica e dano histopatológico no intestino. Tais dados corroboram outros prévios relativos à ação lesiva do irinotecano sobre a mucosa intestinal, descrita por pesquisadores do LAFICA (MELO *et al*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al*, 2012), bem como pesquisadores de outros grupos (IKUNO *et al*, 1995; KURITA *et al*, 2000; GIBSON *et al*, 2003, 2007; LOGAN *et al*, 2008 a,b; STRINGER *et al*, 2007b, 2009a).

A literatura pouco tem mencionado o cólon como um sítio de desenvolvimento de mucosite pós injeção de agentes antineoplásicos. A bem da verdade só encontramos o registro dos trabalhos de Gibson e colaboradores (2003) e de Stringer e colaboradores (2009). No presente estudo foi mostrado que o dano induzido pelo Irinotecano em camundongos não se restringe ao intestino delgado, mas estende-se também ao intestino grosso. Dessa forma foi evidenciado um extenso infiltrado neutrófilo acompanhado de vacuolização das criptas de Lieberkühn. Gibson e colaboradores (2003) descreveram que a injeção de Irinotecano em ratos inoculados previamente com células de adenocarcinoma mamário, provocava um grave dano no intestino delgado, assim como dano no cólon, evidenciado pela presença de células apoptóticas na cripta do cólon, assim como hiperplasia do colon. Stringer e colaboradores (2009) evidenciaram também um considerável dano no cólon de ratos injetados com Irinotecano (200mg/kg i.p, injeção única), com degeneração da cripta e infiltração de células polimorfonucleares na luz intestinal, acompanhada de hiperplasia e corpos mitóticos.

A diarreia é uma das manifestações mais comuns da mucosite intestinal relacionada à quimioterapia do Câncer (ARNOLD *et al*, 2005). A diarreia associada ao Irinotecano apresenta-se em duas fases, uma inicial que acomete 43 a 51% dos pacientes e dentre eles, 7 a 22% dos pacientes com grau severo. A fase tardia, a diarreia apresenta-se de 83 a 88% dos pacientes, e 14 a 31% nos graus 3/4 (KRISHNAMURTHI, DREWS, SAVARESE, 2013).

Em assim sendo, tornou-se relevante estudar a patogênese da mucosite intestinal, partindo de um modelo experimental, no qual a diarreia cursasse como um evento que acompanhasse as demais alterações de caráter inflamatório clássicas da mucosite intestinal.

Os resultados aqui apresentados, utilizando um modelo murino de injeção intraperitoneal diária de Irinotecano 75 mg/kg durante 4 dias, mostraram que a mucosite experimental induzida pelo irinotecano cursou com importante diarreia de grau moderado no quinto dia e grau severo no sétimo dia experimental. Essa manifestação está de acordo com os dados anteriores obtidos por Lima-Junior (2008), que, ao utilizar também camundongos C57BL/6 e duas doses distintas, 60 e 75 mg/kg, evidenciou uma lesão intestinal precoce acompanhada de diarréia já a partir do quinto dia. Por outro lado, tais dados contrastam com aqueles encontrados por Melo e colaboradores em experimentos com camundongos Swiss, onde os eventos de diarreia severa foram observados somente a partir do sexto dia experimental (MELO, 2007). A diarreia induzida pelo Irinotecano está descrita também em outros trabalhos da literatura (Gibson *et al*, 2007; Logan *et al*, 2008; Stringer *et al*, 2009), utilizando o modelo de uma única injeção endovenosa de 200 mg/kg de Irinotecano em ratos. Neste caso os autores mostraram que a diarreia apresenta-se no terceiro dia experimental, sendo de grau moderado a severo, porém com um curso temporal mais curto, vindo a cessar já a partir do quinto dia experimental. O modelo de dose única, entretanto, diferente daquele aqui apresentado, mimetiza pouco o que de fato acontece na prática clínica em que na maioria dos regimes que utiliza irinotecano este é administrado, em doses subsequentes.

Considerando que os mecanismos associados à diarreia induzida pelo irinotecano não estão completamente compreendidos, optou-se por avaliar o funcionamento da barreira intestinal por meio do teste de permeabilidade intestinal aos açúcares lactulose e manitol, bem como o transporte intestinal de íons, pelo teste de perfusão intestinal.

Os dados do presente trabalho, surpreendentemente, evidenciaram uma redução da excreção urinária de lactulose no sétimo dia experimental, sem qualquer alteração da excreção de manitol. É importante ressaltar que um aumento da excreção urinária de lactulose tem sido correlacionado com um dano nas proteínas envolvidas nas junções firmes (*tight junctions*), aumentando o transporte paracelular desse açúcar (LIMA *et al*, 2005). Assim, duas possibilidades foram postuladas na tentativa de prover uma explicação para a diminuição da excreção de lactulose aqui apresentada: 1) um dano renal causado pelo irinotecano poderia

alterar a taxa de excreção da lactulose para menos ou alternativamente, 2) a resistência transepitelial das proteínas de junção estariam aumentadas, favorecendo uma diminuição da passagem do açúcar.

Com o intuito de avaliar a primeira possibilidade, realizou-se a dosagem sérica de creatinina e ureia em animais injetados com irinotecano. Os resultados do presente trabalho, evidenciaram que ambos os marcadores de lesão renal estavam em concentrações séricas idênticas às do grupo controle salina. A segunda possibilidade ainda não foi por nós testada, mas, em um estudo recente publicado por Nakao e colaboradores (2012), observou-se que a expressão de ocludina e claudina-1 encontra-se atenuada após administração de Irinotecano. Em contrapartida, esses autores verificaram um aumento da resistência transepitelial no intestino delgado mesmo com reduzida expressão de proteínas de junção. Uma das justificativas dos autores, foi quanto ao edema tecidual intestinal, o qual pode afetar negativamente a funcionalidade da barreira intestinal por aumentar a resistência desta (NAKAO *et al*, 2012). Estudos *in vitro* posteriores utilizando a camera de Ussing serão necessários, com o objetivo de corroborar nossos achados *in vivo*. Por meio desse teste, podem ser avaliados os efeitos direto do Irinotecano e seu metabólito ativo, o SN38 sobre o transporte de Lactulose e manitol *in vitro*, assim como mensurar a resistência transepitelial.

Em estudo realizado por Gifoni no LAFICA utilizando uma amostragem de 20 pacientes portadores de cancer colorretal metastático tratados no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, com o regime quimioterápico IFL (Irinotecano, 5-FU e Leucovorin) e avaliados antes e após cada ciclo de quimioterapia, foi evidenciada uma clara e significativa diminuição da excreção urinária de manitol, sem contudo, observar-se alteração da excreção de lactulose. Observou-se ainda nesses pacientes uma redução da razão lactulose/manitol (GIFONI, 2012). Esses dados, sugerem que regimes de quimioterapia à base de Irinotecano podem causar uma lesão sobre a área absorptiva do epitélio intestinal de revestimento, levando a uma menor absorção de manitol a partir do intestino. Esses achados aparentemente conflitantes com os obtidos no presente trabalho, podem ser decorrentes da ação combinada do Irinotecano com o 5-FU, o que não aconteceu nos experimentos cá apresentados nos quais o irinotecano foi usado isoladamente.

No presente trabalho, o 5-FU isolado foi utilizado como controle de referência e notou-se que a sua injeção promoveu um aumento nas taxas de excreção tanto de lactulose

como de manitol, o que diferiu dos dados com irinotecano, onde como já discutido anteriormente as alterações se deram apenas sobre a taxa de lactulose. Sukkar e colaboradores (2004) demonstraram que o tratamento adjuvante do cancer colorretal com 5-FU e Levamisol em 12 pacientes, promoveu aumento da excreção urinária de lactulose. Adicionalmente, Carneiro-Filho e colaboradores (2004) demonstraram que outro agente quimioterápico, bastante utilizado no passado no tratamento do cancer de mama, o metotrexato, foi capaz de induzir uma lesão da barreira intestinal, evidenciada pela diminuição da excreção urinária de Manitol e aumento significativo da secreção intestinal de sódio e potássio.

Com relação ao estudo do transporte intestinal de íons por meio do teste da perfusão intestinal, os resultados deste trabalho mostraram que o Irinotecano, a exemplo do metotrexato, parece induzir um aumento da secreção intestinal de sódio, potássio e cloreto, os quais foram mensurados no perfusato intestinal. De modo complementar, Stringer e colaboradores (2009) evidenciaram que o irinotecano induz uma diminuição sérica de sódio em ratos, corroborando com o aumento da secreção intestinal deste íon.

Em conjunto, os resultados ora mostrados aliados aos da literatura fazem crer que o teste de lactulose e manitol pode ser útil na definição do padrão de alteração de barreira secundária aos quimioterápicos antineoplásicos, e que este dano, parece ser diferente para cada quimioterápico utilizado, isoladamente ou em associação. Portanto, o manejo clínico desses pacientes deve levar em consideração o efeito diferenciado de quimioterápicos sobre a barreira do trato gastrointestinal.

È bem sabido que pacientes em tratamento quimioterápico com regimes à base de irinotecano experimentam cólicas abdominais, muitas vezes severas e em grande frequência, associadas à diarreia. De forma inédita, Lima-Júnior e colaboradores (2012) mostraram, de forma bastante elegante, que tiras de duodeno obtidas de camundongos previamente injetados com irinotecano, quando avaliadas *in vitro* apresentam hipercontratilidade frente ao estímulo com acetilcolina, fazendo supor que pode ser esta a causa da cólica abdominal apresentada na prática clínica nos pacientes tratados com irinotecano. Adicionalmente, Belarmino-filho (2010) evidenciou que a resposta inflamatória associada à mucosite por irinotecano desencadeia alterações da motilidade digestória como retardo do esvaziamento gástrico e aceleração do trânsito intestinal, que podem também estar associados à fisiopatologia da

gênese dos sintomas dispépticos, da diarreia e da cólica que normalmente podem acompanhar o curso da mucosite por irinotecano.

Os resultados aqui apresentados, evidenciaram também, que a injeção de irinotecano em camundongos promoveu um aumento do crescimento de bactérias no sangue, assim como o aumento da translocação bacteriana para órgãos estéreis tais como linfonodo mesentérico e fígado. Corroborando esses achados, Nakao e colaboradores (2012) detectaram bactérias no linfonodo mesentérico em 80% dos ratos injetados com uma única dose de irinotecano (200 mg/kg i.p) (NAKAO *et al*, 2012).

A esta altura do trabalho nos perguntamos se, de fato, estávamos diante de um modelo de mucosite com evolução para sepse. Tal sugestão se deveu aos dados supramencionados e também à observação da presença de um acúmulo pulmonar de neutrófilos e de uma reduzida temperatura retal.

Dados da literatura dão conta de que o infiltrado de células pró-inflamatórias está associado a um curso clínico de pior prognóstico na sepse, pois culmina com disfunção sistêmica de órgãos, um dos achados típicos de uma Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) que ocorre durante essa doença (ABRAHAM, 2005). Modelos experimentais clássicos de sepse, tais como o modelo de ligação e punção do ceco (CLP) utilizam exatamente esse parâmetro como uma das referências para a demonstração da progressão do estado septicêmico (ALVES-FILHO *et al*, 2008; SPILLER *et al*, 2010).

Segundo a *American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine*, define-se sepse como uma síndrome clínica que resulta de uma resposta inflamatória à infecção, tendo como critérios a presença de pelo menos duas das seguintes condições, além de uma infecção: 1) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; 2) frequência cardíaca > 90 bpm; 3) frequência respiratória > 20 ipm ou $\text{pCO}_2 < 32$ mmHg; 4) contagem de glóbulos brancos $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4000/\text{mm}^3$ (NEVIERE, PARSONS, HOLLINGSWORTH, 2013). No presente trabalho, foi evidenciada, adicionalmente à bacteremia e à leucopenia, uma diminuição da temperatura retal nos camundongos após a injeção do Irinotecano, achado similar evidenciado no modelo clássico de sepse por CLP (Tao *et al*, 2004). Tao e colaboradores (2004) mostraram uma diminuição significativa da temperatura retal de camundongos após 6, 12 e 18 horas de indução da sepse por CLP.

A interação de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs) com Receptores Toll-Like (TLRs) é capaz de ativar vários fatores de transcrição, particularmente NF- κ B e MAP quinases, e aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias (KAWAI & AKIRA, 2006). A desregulação da sinalização de TLRs em células epiteliais intestinais parece ser um importante fator patogênico no estabelecimento de inflamações intestinais (PODOLSKY, 2002), incluindo a mucosite.

No presente trabalho, investigou-se o papel de TLRs na patogênese da mucosite intestinal por Irinotecano. Dentre eles foram estudados os receptores Toll-like do tipo 2, 4 e 9, receptores NOD1 e a proteína adaptadora MyD88. Um dos motivos principais que nos motivou à realização dessa investigação, foram os achados iniciais da análise imunoistoquímica para TLR4 em amostras de intestino obtidas de animais injetados com Irinotecano, a qual revelou um aumento da imunomarcagem para esse receptor. Aliado a isso, a identificação bioquímica de bacilos gram negativos translocados para o linfonodo mesentérico e fígado, revelou a presença de bactérias gram negativas, como *Escherichia coli* e bactérias gram negativas não fermentadoras, como a *Pseudomonas aeruginosa*. Somado a isso, dados da literatura mostram que o crescimento de Enterobacterias foi observado em pacientes sob tratamento quimioterápico (STRINGER *et al*, 2009b; RAM *et al*, 2012), em colite (LUPP *et al*, 2007; DE SOUZA *et al*, 2012) e no câncer colorretal (AZCÁRATE-PERIL *et al*, 2011; WANG *et al*, 2012), como resultado de uma alteração funcional da mucosa intestinal e do sistema imune associado ao intestino.

Especificamente, evidenciamos neste estudo a participação dos receptores Toll-like do tipo 2 (TLR2), assim como, da proteína adaptadora MyD88 na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo Irinotecano. Nossos resultados mostraram que em animais *knockout* para TLR2 ou *knockout* para MyD88, não foram observadas a perda ponderal e o dano funcional relacionado à diarreia, bem como as alterações morfométricas e histopatológicas claramente observadas nos animais selvagens tratados com Irinotecano.

Kaczmarek e colaboradores (2012) evidenciaram que camundongos geneticamente deficientes em TLR2^{-/-} ou em MyD88, quando expostos ao tratamento com doxorrubicina, outro agente antineoplásico, não apresentaram aquelas alterações histopatológicas, a infiltração de neutrófilos no íleo, bem como o aumento de células apoptóticas nas criptas do íleo, observadas nos respectivos animais selvagens injetados com doxorrubicina. Os autores

então sugeriram que a deficiência do receptor TLR2 ou de MyD88, previne a mucosite intestinal induzida pela doxorrubicina. Coerentemente o mesmo grupo de pesquisa havia previamente demonstrado que a via de sinalização TLR2/TLR9-MyD88 tem um papel fundamental na deflagração da resposta inflamatória aguda associada com apoptose, que se segue ao tratamento com doxorrubicina. Para tal os autores utilizaram camundongos *knockout* para TLR2, TLR9 ou MyD88, assim como seus respectivos controles selvagens. (Kryosko *et al*, 2011)

Em referência ao papel do receptor TLR9 na mucosite induzida por agentes antineoplásicos, os resultados do presente trabalho, em que se utilizou o irinotecano como agente indutor, frontalmente diferem daqueles observados quando o agente antineoplásico era a doxorrubicina, uma vez que mostraram que camundongos geneticamente deficientes do receptor Toll-like tipo 9 apresentaram sinais de diarreia, perda de peso, leucopenia e bacteremia. Tais dados nos permitem concluir que TLR9 pode exercer diferentes papéis moduladores em função do tipo de agente antineoplásico na indução de mucosite.

Curiosamente, Trevelin e colaboradores (2012) muito recentemente demonstraram que camundongos geneticamente deficientes para o receptor Toll-like 9, nos quais induziu-se sepse experimental pelo CLP, não apresentaram falência na migração de neutrófilos, assim como menor taxa de resposta inflamatória sistêmica e dessa forma tiveram uma melhora na sobrevivida. Esses autores sugeriram que o mecanismo pelo qual esse fenômeno ocorre parece envolver o aumento da expressão de receptores para quimiocinas, como o CXCR2, e reduzida expressão da proteína GRK2, a qual tem papel na internalização de receptores acoplados à proteína G, como o de quimiocinas (TREVELIN *et al*, 2012). Portanto, a ativação de TLR9 seria de pior prognóstico na sepse.

Adicionalmente, Alves-Filho *et al* (2009) demonstraram que camundongos *knockout* para TLR2 apresentaram melhor capacidade de conter o crescimento bacteriano sistêmico, além de apresentarem melhores taxas de sobrevivida e baixa resposta inflamatória sistêmica, por um mecanismo regulador similar ao descrito por Trevelin *et al* (2012) para o receptor TLR9, envolvendo a modulação de receptores de quimiocinas. Em nosso trabalho, não sabemos ainda explicar a razão de observarmos uma proteção contra o desenvolvimento de mucosite somente para o grupo de camundongos *knockout* para TLR2.

Entretanto, é claro que, apesar do nosso modelo apresentar alguns sinais sugestivos de sepse, o padrão de resposta fisiopatológico da mucosite parece distinto daquele estudado no modelo experimental de sepse por CLP, em que, pelo menos do nosso ponto de vista, parece ser muito mais drástico que o de mucosite intestinal induzido por irinotecano. Outra diferença relevante é que no modelo de CLP há perfuração do ceco com a liberação, na cavidade peritoneal, de bactérias com características muito diversas (sepse polimicrobiana). Em nosso modelo, o perfil de bactérias em translocação parece ser bem distinto daquele observado no modelo de CLP, justificando um padrão de resposta fisiopatológica diferenciado.

O papel de TLRs tem sido investigado também em outras lesões do trato gastrointestinal. Nas doenças inflamatórias intestinais, por exemplo, a ativação de receptores TLR2 e TLR4 parece ter um papel relevante para o desenvolvimento do dano no intestino grosso e delgado desses pacientes (CARIO & PODOLSKY, 2000). Adicionalmente, em pacientes com colite ulcerativa ou com Doença de Crohn, tanto TLR2 como TLR4 apresentam-se marcadamente expressos no epitélio intestinal desses pacientes (CARIO & PODOLSKY, 2000; FROLOVA *et al*, 2008). De forma similar ao encontrado neste estudo, foi evidenciado um aumento da imunomarcagem para TLR4 nas amostras intestinais obtidas de animais tratados com irinotecano.

Entretanto, a expressão e o papel de diferentes TLR, bem como das vias de sinalização reguladas por estes receptores, em relação às doenças intestinais parecem variar a depender da condição patológica em questão (GAO *et al*, 2012 a,b). Gao e colaboradores (2012 a,b) sugeriram que o *Clostridium butyricum*, utilizado como probiótico no tratamento da diarreia, ativa, via TLR2, a síntese de citocinas de padrão anti-inflamatório, como IL-10, por um mecanismo outro, independente de MyD88. Contudo, a sinalização de TLRs, via MyD88, parece ter papel relevante no desenvolvimento da inflamação intestinal, visto que a deleção gênica para esta proteína adaptadora é capaz de prevenir o desenvolvimento de colite espontânea induzida pela microbiota comensal em camundongos *knockout* para IL-10 e MyD88 (camundongos duplo *knockout*, MyD88^{-/-},IL-10^{-/-}) (RAKOFF-NAHOUM *et al*, 2006; HOSHI *et al*, 2012).

De fato, a mudança no perfil de bactérias intestinais secundária ao tratamento com Irinotecano foi descrito por Stringer e colaboradores (2008). De acordo com esses autores, a diarreia promovida pelo Irinotecano pode ser causada pelo aumento de bactérias, como

Escherichia coli, produtoras de beta-glicuronidases no intestino, o que pode levar à possibilidade de modulação terapêutica desse desequilíbrio da microbiota intestinal através do tratamento com antibióticos e/ou probióticos (STRINGER *et al*, 2008).

Considerando que o Irinotecano é capaz de modificar o equilíbrio da microbiota comensal intestinal, contribuindo para o desenvolvimento da mucosite, e que a proteína MyD88 tem papel sinalizador importante para muitos receptores de produtos dessas bactérias, optou-se por investigar se animais *knockout* para MyD88 apresentariam modificação no curso da mucosite intestinal. De fato observou-se que a deleção gênica para esta proteína conferiu uma menor perda ponderal, reduzida diarreia, infiltração neutrofílica e danos histopatológicos intestinais significativamente atenuados, bem como reduzida bacteremia.

É importante destacar que a proteína MyD88 sinaliza não somente receptores Toll-like, mas também tem função adaptadora para receptores de citocinas pró-inflamatórias da família da interleucina-1, como IL-1 β e IL-18. Lima-Júnior (2008) e Freitas (2007) demonstraram que animais *knockout* para a citocina IL-18 e que receberam Irinotecano apresentam melhora nos parâmetros funcionais intestinais (diarreia e hipercontratilidade de tiras isoladas de intestino), além de apresentarem reduzida alteração histopatológica e menor infiltração de neutrófilos no intestino quando comparado ao grupo selvagem injetado com Irinotecano. De modo mais importante, a administração da proteína ligante para IL-18 (IL-18bp), que bloqueia a função biológica pró-inflamatória da IL-18, apresentou resultados similares à deleção gênica para IL-18 (LIMA-JÚNIOR, 2008; FREITAS, 2007). Ressalta-se, ainda, que o bloqueio farmacológico ou gênico da sinalização de IL-18 preveniu a ativação de óxido nítrico, detectada pela redução da atividade da óxido nítrico sintase induzida (LIMA-JÚNIOR, 2008; FREITAS, 2007). Possivelmente, a marcante resposta protetora encontrada no trabalho aqui mostrado, com relação ao efeito da proteína MyD88 reflete não somente a modulação da sinalização de receptores Toll-like, mas também a modulação mais ampla da ação das citocinas da família da IL-1, que inclui além da IL-1 β , a IL-1 α , a IL-1Ra e a IL-18.

Sabe-se, ainda, que a ativação de receptores TLR pode promover a síntese de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e KC, cuja participação na mucosite intestinal induzida por irinotecano foi previamente descrita pelos pesquisadores do LAFICA (Melo *et al*, 2008), assim como a síntese de IL-6 por Logan e colaboradores (2008). Nesse sentido, o grupo do LAFICA (Melo *et al*, 2008) demonstrou que a modulação inespecífica de citocinas

pro-inflamatórias por drogas como a pentoxifilina, parece promover uma melhora significativa do dano histopatológico intestinal, assim como uma melhora nos parâmetros inflamatórios promovidos pela injeção de irinotecano em camundongos. Por outro lado, a inibição específica de TNF- α , com o uso de anticorpo monoclonal anti-TNF, infliximabe, não foi capaz de reverter a perda ponderal, nem os parâmetros funcionais (diarreia), apesar de prevenir o desenvolvimento da resposta inflamatória, todos descritos na mucosite intestinal que se segue à injeção de irinotecano (FIGUEIREDO, 2012).

Assim, a constatação de que a ativação da resposta imune via TLR à microbiota intestinal parece ser relevante também no contexto da mucosite, sugere que a modulação farmacológica desses receptores teria um impacto terapêutico clinicamente relevante por regular a ativação de importantes citocinas envolvidas na lesão intestinal.

É realmente curioso o fato, de camundongos *Knockout* para o receptor TLR4 não terem apresentado uma melhora da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano. Clinicamente, como descrito anteriormente, o maior grau de ameaça à vida em pacientes que desenvolvem mucosite por quimioterapia está francamente associado ao desenvolvimento de sepse. Em uma revisão publicada por Barochia e colaboradores (2011), avaliou-se o racional para o uso do Eritoram tetrasódico, um antagonista do LPS, no tratamento da sepse. Nessa revisão, relata-se o atual desenvolvimento de um estudo clínico Fase III do Eritoram, revelando um possível benefício terapêutico deste antagonista em pacientes sépticos com alto risco de morte, entretanto uma potencial resposta deletérea foi observada naqueles pacientes sépticos com baixo risco de morte (BAROCHIA *et al*, 2011). Possivelmente, no modelo experimental de mucosite, a sepse ainda não atingiu o perfil de mais alta gravidade. Desta forma, o bloqueio da sinalização do TLR4, pela deleção gênica, não seria vantajosa nesse modelo experimental.

Os mecanismos moleculares da interação entre TLRs e outros receptores de reconhecimento padrão (PRRs) do sistema imune inato estão começando a emergir, envolvendo principalmente os receptores NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain). Uma função na homeostase imunológica tem sido atribuída à interação entre os receptores Toll-like e NOD.

Sabe-se que o LPS bacteriano pode ter ação tanto em receptores de membrana celular, como TLR4, como atuar em nível citoplasmático. Esse movimento intracelular parece ser necessário para certas respostas celulares, visto que substâncias que bloqueiam o transporte vesicular, como a Wortmannin, bloqueiam a adesão de neutrófilos, mediada por integrinas, desencadeada pelo LPS (Revisto por TAKEDA et al, 2003). O principal candidato a receptor para o LPS no citoplasma é o NOD1, cuja ação leva à ativação de NF- κ B e síntese de citocinas pró-inflamatórias (Revisto por TAKEDA et al, 2003), muitas das quais observadas na mucosite intestinal (MELO *et al*, 2008).

Uehara e Takada (2008) demonstraram que a ação sinérgica de NOD1 e 2 com agonistas de TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, assim como de TLR2, induz uma resposta antibacteriana, com síntese de β -defensinas 2, na cavidade oral, sugerindo que a contribuição do epitélio oral para o desenvolvimeto da imunidade inata é intensificada em processos inflamatórios. Em outro estudo, Tada e colaboradores (2005) investigaram o papel de células dendríticas humanas na ativação de resposta Th1 induzidas por agonistas de NOD1 e NOD2 em combinação com agonistas de receptores Toll-like no contexto da hipersensibilidade tardia. Nesse estudo, demonstrou-se que agonistas de receptores NOD e de TLR3, TLR4 e TLR9, mas não de TLR2, foram capazes de, sinergisticamente, promover a ativação de interleucina 12 (IL-12), uma citocina responsável pela ativação da via Th1, com síntese de IFN- γ , uma citocina efetora desta via (TADA *et al*, 2005).

Freitas (2007) e Lima-Júnior (2008) já haviam demonstrado o papel deletério da IL-18 na mucosite intestinal induzida por irinotecano. Ao que se sabe esta citocina atua de modo sinérgico com a IL-12 na ativação da via Th1, que parece ser fundamental para o curso deletério observado na mucosite. Assim, com base nos estudos de Uehara e Takada (2008) e de Tada *et al* (2005) supramencionados, percebe-se que ainda não há clareza quanto à forma de interação entre a sinalização de receptores TLR e NOD e como essas vias se comunicam para gerar efeitos sinérgicos, nem como estas participariam na evolução da mucosite intestinal. Contudo, no trabalho cá apresentado ficou evidente uma significativa proteção apenas da diarreia em animais NOD1^{-/-}, sem, contudo, haver atenuação dos parâmetros inflamatórios. Isso contrasta com o observado em animais TLR2^{-/-}, que apresentaram proteção contra a resposta inflamatória e contra a diarreia e a perda ponderal. Portanto, há

clara necessidade de se investigar esse aspecto envolvendo TLRs e receptores NOD na mucosite.

Tendo em conta, que o modelo experimental de mucosite intestinal induzida pelo irinotecano cursa com um importante dano funcional, relacionado à diarreia, hipotetizamos se o metabólito ativo do Irinotecano, o SN-38, seria o deflagrador do dano funcional, assim como o é da inflamação associada à mucosite.

O SN-38 é gerado a partir do Irinotecano por carboxilesterases e subsequentemente conjugado a SN-38G por UDP-glicuroniltransferases hepáticas. A forma glicuronizada do SN-38 é inativa e excretada no intestino e eliminada nas fezes (RIVORY *et al*, 1997). Alguns estudos apontam para o papel de β -glucoronidases microbianas intestinais como um fator relevante na reativação do SN-38 no intestino, o que causaria o dano à mucosa (GUPTA *et al*, 1994).

Diversos trabalhos mostram a utilização do modelo de alça intestinal isolada, dentre eles, podemos citar os estudos de enterite induzida pelo *Clostridium difficile* (LIMA AA *et al*, 1988; ROCHA *et al*, 2001; CAVALCANTE *et al*, 2006; BARRETO *et al*, 2008; MEDEIROS *et al*, 2011; DE ARAUJO JUNQUEIRA *et al*, 2011; WARREN *et al*, 2012), assim como, os estudos de secreção intestinal induzido pela Tóxina da Cólera (GUERRANT *et al*, 1994; ROCHA *et al*, 2003). Nesse modelo, é possível avaliar de forma direta o efeito de substâncias tóxicas/toxinas sobre o epitélio de revestimento intestinal por meio da mensuração de parâmetros secretórios e inflamatórios.

Lima e colaboradores (1988) demonstraram que a injeção de toxina A do *Clostridium difficile*, em alça intestinal de coelho, provocou uma significativa infiltração de células mononucleares e uma potente secreção intestinal semelhante àquela produzida pela toxina do *Vibrio cholerae*. Já é relatado na literatura que a resposta da toxina da cólera tem efeito direto sobre a ativação de adenilato ciclase na mucosa intestinal, com ativação de AMP cíclico e estimulação de proteínas quinase dependentes de AMP cíclico e secreção de cloreto (GILL & WOOLKALIS, 1985). Assim, depreende-se que a toxina da cólera parece causar uma marcante secreção (ROCHA *et al*, 2003), sem resposta inflamatória subjacente (VIANA *et al*, 2002). Portanto, se o SN-38 é o responsável pelo dano à mucosa, se tem potencial secretório

e/ou inflamatório, o modelo de alça isolada *in vivo* teria, pelo menos potencialmente, como responder a este questionamento.

A dúvida quanto à participação ou não do SN-38 no dano intestinal associado ao Irinotecano decorre da observação da toxicidade de outros quimioterápicos antineoplásicos também considerados pró-drogas, como a ciclofosfamida e ifosfamida. Sabe-se que a metabolização hepática desses agentes gera um metabólito que responde pela atividade citotóxica antitumoral (mostarda de fosforamida e mostarda de isofosforamida) e um que está relacionado à toxicidade vesical, a acroleína (causando cistite hemorrágica), absolutamente destituído de atividade antitumoral (Revisto por RIBEIRO *et al*, 2012).

Curiosamente, nossos resultados evidenciaram que o SN-38 não causou secreção intestinal na alça isolada de camundongos. Contudo, o metabólito ativo SN3-8 foi capaz de induzir aumento da atividade de mieloperoxidase, um indicador da infiltração de neutrófilos, evidenciando assim um claro componente pró-inflamatório. Entretanto, o Irinotecano utilizado como controle experimental, foi capaz de induzir um aumento da secreção intestinal na alça isolada. Estes achados sugerem duas informações relevantes: 1) O SN-38, pelo menos sob as condições experimentais aqui observadas, não seria o responsável pelo componente secretor associado à diarreia, porém, responderia pelos achados inflamatórios referidos para a mucosite intestinal induzida pela quimioterapia. 2) O potencial secretório da administração aguda do Irinotecano, observado nesse modelo, já é descrito na literatura como um efeito colinérgico direto desse fármaco, que foi aqui corroborado (HYATT *et al*, 2005).

Hyatt e colaboradores (2005) demonstraram que a porção 4-piperidino-piperidina do Irinotecano é a responsável pela inibição da acetilcolinesterase. Contudo, o SN-38, que representa a molécula do Irinotecano sem a porção 4-piperidino-piperidina, não teve efeito inibitório sobre a acetilcolinesterase humana, corroborando nossos achados. Compreendemos que a prova do conceito ainda deve ser realizada, possivelmente tratando-se os animais com um agente anticolinérgico clássico como a atropina, previamente à injeção na alça isolada de irinotecano.

Adicionalmente, avaliou-se a ação *in vitro*, do SN38 sobre uma monocultura de células epiteliais intestinais de rato (IEC-6). Nesse contexto, evidenciou-se que o SN38 apresentou uma elevada citotoxicidade nas IEC-6 (10 vezes mais que o irinotecano), bem

como promoveu alterações morfológicas, associadas a um aumento de células com núcleos picnóticos. Tais sinais são indicativos de morte celular, o que já era de se esperar de um fármaco antineoplásico.

Um efeito inédito, demonstrado no presente trabalho, foi a descrição das alterações morfológicas *in vitro* e inflamatórias e histopatológicas *in vivo* induzidas pelo SN-38. Há agora a necessidade, de se explorar os mecanismos através dos quais o SN-38 causa essas alterações descritas, ao exemplo do que foi demonstrado, por exemplo para a toxina A do *Clostridium difficile* (SANTOS *et al*, 2013). De forma bastante elegante, recentemente, Santos e colaboradores (2013) descreveram através do uso de microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e microscopia de fluorescência, as alterações morfológicas celulares decorrentes da incubação de células IEC-6 com toxina A do *C. difficile*. Descreveram, também, o colapso da F-actina do citoesqueleto celular, e ainda que a monoglicosilação da proteína Rho, que está envolvida na formação de filamentos de actina, leva a esse colapso do citoesqueleto (SANTOS *et al*, 2013). Destaca-se, ainda neste trabalho, o efeito protetor da glutamina e da L-alanil glutamina contra essas alterações (SANTOS *et al*, 2013). Dessa forma, pretende-se num futuro bem próximo estudarem-se os efeitos do SN-38 assim como os mecanismos, em cultura de células IEC-6 através dessa mesma abordagem experimental.

O manejo dos eventos de diarreia aumenta o custo do tratamento do Câncer. Nesse sentido, muitas terapias farmacológicas têm sido propostas com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes, tendo como base diversas evidências experimentais e clínicas (GIBSON *et al*, 2013).

Bowen e colaboradores (2007) mostraram que o uso de probiótico VSL#3 previne a diarreia e a perda ponderal em ratos induzido pelo irinotecano. Em adição, dados do nosso laboratório evidenciaram que o *Saccharomyces boulardii* reverte as alterações na motilidade gastrointestinal associada a mucosite por 5-FU em camundongos (JUSTINO, 2011). Sezer e colaboradores (2009), também demonstraram que esses probióticos reduzem a mucosite intestinal e a diarreia relacionadas ao irinotecano em ratos.

Adicionalmente, alguns estudos sugerem que o uso de antibióticos para o tratamento de bactérias intestinais possa reduzir a toxicidade do irinotecano (TAKASUNA *et al*, 1998).

Nesse sentido, Alimonte *et al* (2003) propuseram o tratamento da toxicidade do Irinotecano (protocolo Saltz (Irinotecano 180 mg/m²) com neomicina e bacitracina. Nesse estudo, foi demonstrado a combinação desses dois antibióticos, conferiu uma melhora nos quadros clínicos dos pacientes, reduzindo a diarreia, quando comparado aos pacientes que receberam somente neomicina (ALIMONTE *et al*, 2003). Contudo, o estudo de Jong *et al* (2006) indicou que, antes da instituição da terapia preventiva com neomicina em pacientes recebendo protocolos à base de Irinotecano, seja realizada a identificação genotípica para UGT1A1*28 (que tem uma repetição TA adicional na região promotora do gene da Uridina difosfato-glicuroniltransferase 1A1), de forma a garantir a eficácia da neomicina.

Recentemente, Gibson e colaboradores (2013) publicaram uma revisão sistemática sobre o uso de agentes no manejo clínico de mucosite intestinal. Estes consistem nas Diretrizes da Associação Multinacional dos Cuidados de Suporte em Câncer/ Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO). As diretrizes sugerem o uso de probióticos contendo *Lactobacillus spp.* para a prevenção da diarreia induzida pela quimioterapia e radioterapia em pacientes com neoplasias pélvicas.

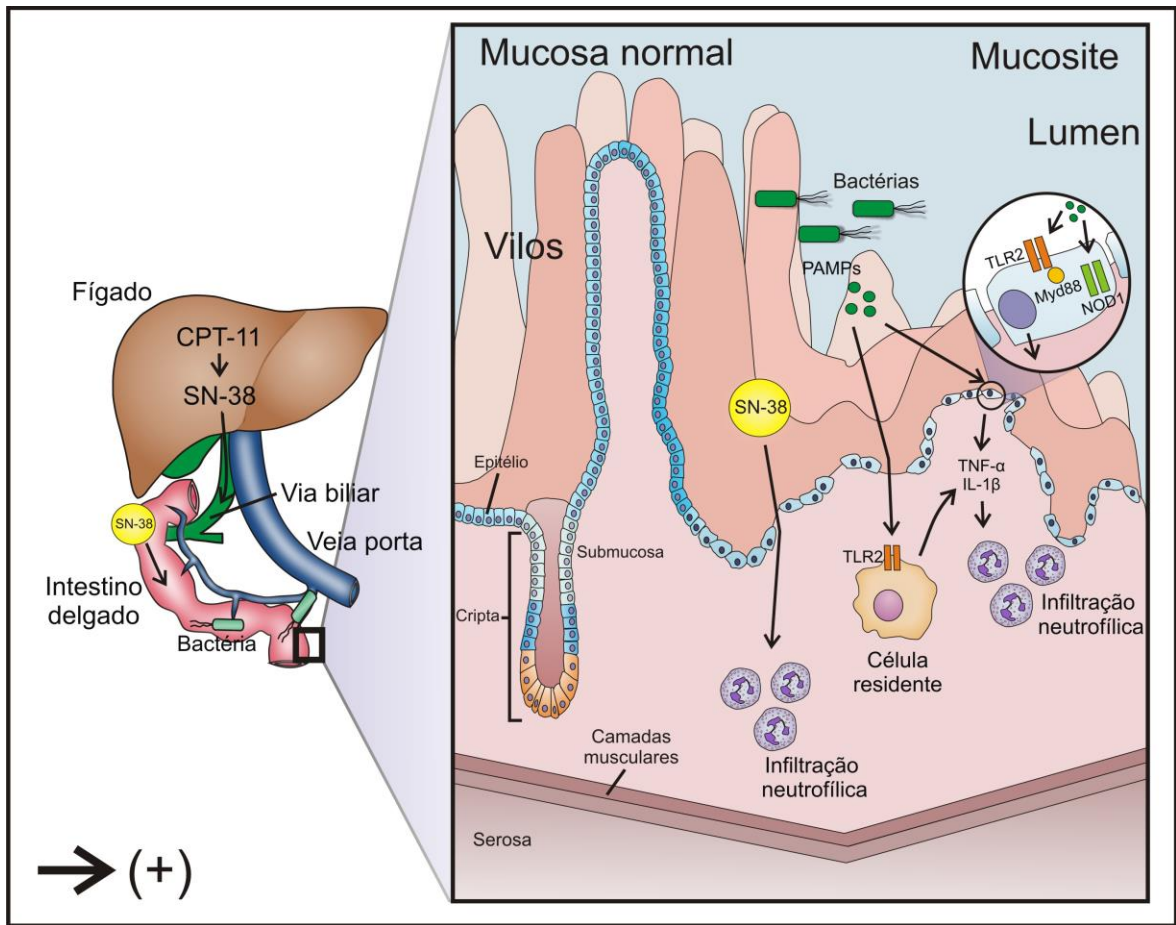
Assim, baseado no painel de diretrizes apresentado pela MASCC/ISOO compreendemos que o adequado manejo clínico da mucosite intestinal ainda não está claramente estabelecido. Somente através de pesquisas relativas ao melhor conhecimento fisiopatológico dessa doença é que esse sucesso possivelmente pode ser alcançado. Portanto, é exatamente nesse sentido que acreditamos que esta tese possa contribuir apontando novas perspectivas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- ✓ Com base nos resultados encontrados no presente estudo, sugere-se que o irinotecano altera a permeabilidade de barreira intestinal a eletrólitos, além de contribuir para o estabelecimento de translocação bacteriana e bacteremia. Adicionalmente, sugere-se que a diarreia associada ao irinotecano esteja relacionada à ativação de receptores NOD1 e TLR2. Este último atuando via proteína adaptadora MyD88 parece regular também o processo inflamatório subjacente. Por fim, sugere-se que o dano morfológico e infiltrado neutrófilo intestinal em animais injetados com irinotecano seja causado pelo metabólito ativo SN38 (**Fig. 74**).

Figura 74 - Modelo Hipotetico proposto da patogênese da mucosite intestinal.



Referências

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM E. Alterations in cell signaling in sepsis. **Clin Infect Dis.** 41 (7):459-64, 2005.

AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signaling. **Nat Rev Immunol**, 4: 499-511, 2004.

AHMAD-NEJAD P *et al.* Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. **Eur. J. Immunol**, 32: 1958-1968, 2002.

ALIMONTI A, SATTA F, PAVESE I, BURATTINI E, ZOFFOLI V, VECCHIONE A. Prevention of irinotecan plus 5-fluorouracil/leucovorin-induced diarrhoea by oral administration of neomycin plus bacitracin in first-line treatment of advanced colorectal cancer. **Ann Oncol**; 14:805-6, 2003.

AL-DASOOQI N, BOWEN JM, GIBSON RJ, LOGAN RM, STRINGER AM, KEEFE DM. Irinotecan-induced alterations in intestinal cell kinetics and extracellular matrix component expression in the dark agouti rat. **Int J Exp Pathol**; 92:357-65, 2011.

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

ALVES-FILHO JC, FREITAS A, SOUTO FO, SPILLER F, PAULA-NETO H, SILVA JS, GAZZINELLI RT, TEIXEIRA MM, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**; 106(10): 4018-23, 2009.

ARANCIBIA SA, BELTRÁN CJ, AGUIRRE IM, SILVA P, PERALTA AL, MALINARICH F *et al.* Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**, 40(2): 97-112, 2007.

ARNOLD RJ, GABRAIL N, RAUT M *et al.* Clinical implications of chemotherapy-induced diarrhea in patients with cancer. **J Support Oncol**, 3:227-232, 2005.

ASHKAR AA, ROSENTHAL KL. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. **Curr Mol Med**, 2(6): 545-56, 2002.

BARRETO AR, CAVALCANTE IC, CASTRO MV, JUNQUEIRA AF, VALE MR, RIBEIRO RA, SOUZA MH, BRITO GA. Fucoidin prevents Clostridium difficile toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig Dis Sci.** 53(4): 990-6, 2008.

BAROCHIA A, SOLOMON S, CUI X, NATANSON C, EICHACKER PQ. Eritoran tetrasodium (E5564) treatment for sepsis: review of preclinical and clinical studies. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, 7(4): 479-94, 2011.

BELARMINO-FILHO JN. **Modulação da resposta inflamatória com dexametasona reverte a dismotilidade gastrintestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.** Fortaleza; 2010. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Ceará].

BENSON AB III, AJANI JA, CATALANO RB *et al.* Recommended guidelines for the treatment of cancer treatment-induced diarrhea. **J Clin Oncol.** 22:2918-2926, 2004.

BOWEN JM, STRINGER AM, GIBSON RJ, YEOH ASJ, HANNAM S, KEEFE DMK. VSL#3 Probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. **Cancer Biology & Therapy**, 6(9): 1449-1454, 2007.

BUROKER TR, O'CONNELL MJ, WLEAND HS. Randomized comparison of two schedules of fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol**, 12: 14-20, 1994.

BRANDI G1, DABARD J, RAIBAUD P, DI BATTISTA M, BRIDONNEAU C, PISI AM, MORSELLI LABATE AM, PANTALEO MA, DE VIVO A, BIASCO G. Intestinal microflora and digestive toxicity of irinotecan in mice. **Clin Cancer Res.** 12(4):1299-307, 2006.

BRAGA-NETO MB, AGUIAR CV, MACIEL JG, OLIVEIRA BM, SEVILLEJA JE, ORIÁ RB, BRITO GA, WARREN CA, GUERRANT RL, LIMA AA. Evaluation of HIV protease and nucleoside reverse transcriptase inhibitors on proliferation, necrosis, apoptosis in intestinal epithelial cells and electrolyte and water transport and epithelial barrier function in mice. **BMC Gastroenterol.** 11(10): 90, 2010.

BRADLEY PP, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.** 60(3):618-22, 1982.

CARIO E, PODOLSKY DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. **Infect Immun,** 68: 7010–7017, 2000.

CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, I.P.F.; ARAUJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G.H.P.; BRITO, G.A.C.; LIMA, V.; MONTEIRO, S.M.N.; SANTOS, F.N.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A.A.M. Intestinal Barrier Function and secretion in Methotrexate-Induced Rat Intestinal Mucositis. **Digestive Disease and Science.** 49 (1): 65-72, 2004.

CASTOLDI A1, BRAGA TT, CORREA-COSTA M, AGUIAR CF, BASSI ÊJ, CORREA-SILVA R, ELIAS RM, SALVADOR F, MORAES-VIEIRA PM, CENEDEZE MA, REIS MA, HIYANE MI, PACHECO-SILVA Á, GONÇALVES GM, SARAIVA CÂMARA NO. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis. **PLoS One.** 7(5):e37584, 2012.

CAVALCANTE IC, CASTRO MV, BARRETO AR, SULLIVAN GW, VALE M, ALMEIDA PR, LINDEN J, RIEGER JM, CUNHA FQ, GUERRANT RL, RIBEIRO RA, BRITO GA. Effect of novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on Clostridium difficile toxin A-induced murine ileal enteritis. **Infect Immun.** 74(5): 2606-12, 2006.

CÔTÉ JF, KIRZIN S, KRAMAR A, et al. UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. **Clin Cancer Res;** 13:3269-75, 2007.

CURI & PERES. **Como Cultivar Células.** 271f. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2005.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.** 70: 369-413, 2001.

CHAMAILLARD M, HASHIMOTO M, HORIE Y, MASUMOTO J, QIU S, SAAB L, *et al.* An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. **Nat Immunol,** 4(7): 702-7, 2003.

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

CHESTER, J.D.; JOEL, S.P.; CHEESEMAN, S.L.; HALL, G.D.; BRAUN, M.S.; PERRY, J.; DAVIS, T.; BUTTON, C.J.; SEYMOUR, M.T. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J Clin Oncol.** 21 (6): 1125-1132, 2003.

CLEVERS H. At the crossroads of inflammation and cancer. **Cell**, 118: 671-674, 2004.

DE ARAÚJO JUNQUEIRA AF, DIAS AA, VALE ML, SPILBORGHS GM, BOSSA AS, LIMA BB, CARVALHO AF, GUERRANT RL, RIBEIRO RA, BRITO GA. Adenosine deaminase inhibition prevents *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. **Infect Immun**. 79(2): 653-62, 2011.

CROWN JP1, BURRIS HA 3RD, BOYLE F, JONES S, KOEHLER M, NEWSTAT BO, PARIKH R, OLIVA C, PRESTON A, BYRNE J, CHAN S. Pooled analysis of diarrhea events in patients with cancer treated with lapatinib. **Breast Cancer Res Treat**. 112(2):317-2, 2008.

DE BOISSIEU D, DUPONT C, BADOUAL J. Allergy to nondairy proteins in mother's milk as assessed by intestinal permeability tests. **Allergy**; 49:882-4, 1994.

DE JONG FA, KEHRER DF, MATHIJSEN RH, CREEMERS GJ, DE BRUIJN P, VAN SCHAIK RH, PLANTING AS, VAN DER GAAST A, ESKENS FA, JANSSEN JT, RUIT JB, VERWEIJ J, SPARREBOOM A, DE JONGE MJ. Prophylaxis of irinotecan-induced diarrhea with neomycin and potential role for UGT1A1*28 genotype screening: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Oncologist**; 11(8):944-54, 2006.

De GRAMONT A; FIGER, A; SEYMOUR M. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol** 18: 2938-2947, 2000.

DUNCAN M, GRANT G. Review article: oral and intestinal mucositis-causes and possible treatments. **Aliment. Pharmacol Ther**, 18: 853-868, 2003.

ELTING LS, COOKSLEY C, CHAMBERS M, CANTOR SB, MANZULLO E, RUBENSTEIN EB. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**, 98 (7): 1531-1539, 2003.

ELTING LS, COOKSLEY CD, CHAMBERS MS, GARDEN AS. Risk, outcomes, and costs of Radiation-Induced Oral Mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 68(4):1110-20, 2007.

ENZINGER PC, KULKE MH, CLARK JW, RYAN DP, KIM H, EARLE CC, VINCITORE MM, MICHELINI AL, MAYER RJ, FUCHS CS. A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig Dis Sci**. 50(12): 2218-23, 2005.

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

FERLAY J, SHIN H, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer: GLOBOCAN 2011. **Int J Cancer** 127:2893-917, 2011.

FIGUEIREDO AA. **Efeito do anticorpo anti-TNF- α , infliximabe, sobre a mucosite intestinal experimental induzida por Irinotecano.** Fortaleza; 2011. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Ceará].

FITZGERALD KA1, ROWE DC, BARNES BJ, CAFFREY DR, VISINTIN A, LATZ E, MONKS B, PITHA PM, GOLENBOCK DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. **J Exp Med.** 98(7):1043-55, 2003.

FUJII H, KOSHIYAMA M, KONISHI M, YOSHIDA M, TAUCHI K. Intermittent, repetitive administrations of irinotecan (CPT-11) reduces its side-effects. **Cancer Detect Prev.** 26(3):210-2, 2002.

FRANCHIMONT D, VERMEIRE S, EL HOUSNI H, PIERIK M, VAN STEEN K, GUSTOT T, QUERTINMONT E, ABRAMOWICZ M, VAN GOSSUM A, DEVIERE J, RUTGEERTS P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut,** 53: 987-992, 2004.

FRANCHI L, WARNER N, VIANI K, NUÑEZ G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev.** 227(1):106-28, 2009.

FREITAS HC. **Envolvimento da Interleucina 18 (IL-18) na patogênese da mucosite gastrointestinal induzida por cloridrato de irinotecano.** Fortaleza; 2007. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Ceará].

FROLOVA L, DRASTICH P, ROSSMANN P, KLIMESOVA K, TLASKALOVA-HOGENOVA H. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. **J Histochem Cytochem,** 56: 267-274, 2008.

GAO Q, QI L, WU T, WANG J. *Clostridium butyricum* activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells. **Mol Cell Biochem,** 361(1-2): 31-7, 2012a.

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,** 12:100, 2012b.

GIBSON RJ, BOWEN JM, INGLIS MR, CUMMINS AG, KEEFE DM. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J Gastroenterol Hepatol**. 18(9):1095-100, 2003.

GIBSON RJ, KEEFE DM. Cancer chemotherapy-induced Diarrhea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer**. 14(9): 890–90, 2006

GIBSON RJ, BOWEN JM, ALVAREZ E, FINNIE J, KEEFE DM. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy**.53(5):360-9, 2007.

GIBSON RJ, KEEFE DM, LALLA RV, BATEMAN E, BLIJLEVENS N, FIJLSTRA M, KING EE, STRINGER AM, VAN DER VELDEN WJ, YAZBECK R, ELAD S, BOWEN JM. Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**. 21(1):313-26, 2013.

GILL DM, WOOLKALIS M. Toxin which activates adenylate cyclase. **Ciba Found Sym**, 112: 57-73, 1985.

GIFONI MAC. **Mucosite e Alterações de permeabilidade intestinal em pacientes portadores de Câncer Colorectal Metastático tratados com 5-Fluorouracil (5-FU) e Irinotecano (CPT-11)**. Fortaleza, 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente].

GOLDBERG RM, GILL S. Recent phase III trials of fluorouracil, irinotecan, and oxaliplatin as chemotherapy for metastatic colorectal cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**. 54 (1):S57-64, 2004.

GÖKE M, PODOLSKY DK. Regulation of the mucosal epithelial barrier. **Bailliere's Clinical Gastroenterology**, 10(3): 393-405, 1996,

GUERRANT RL, FANG GD, THIELMAN NM, FONTELES MC. Role of platelet activating factor in the intestinal epithelial secretory and Chinese hamster ovary cell cytoskeletal responses to cholera toxin. **Proc Natl Acad Sci**, 91(20): 9655-8, 1994.

GUICHARD, S.; TERRET, C.; HENNEBELLE, I.; LOCHON, I.; CHEVREAU, P.; FRÉTIGNY, E.; SELVES, J.; CHATELUT, E.; BUGAT, R. CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. **Br J Cancer**, 80: 364-70, 1999.

GUPTA E., LESTINGI T. M., MICK R., RAMIREZ J., VOKES E. E., RATAIN M. J. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. **Cancer Res.**, 54: 3723-3725, 1994.

HASHIMOTO C, HUNDSON KL, ANDERSON KV. The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. **Cell**, 52: 269-279, 1988.

HYATT JL, TSURKAN L, MORTON CL, YOON KJ, HAREL M, BRUMSHTEIN B, SILMAN I, SUSSMAN JL, WADKINS RM, POTTER PM. Inhibition of acetylcholinesterase by the anticancer prodrug CPT-11. **Chem Biol Interact**; 157-158: 247-52, 2005

IKUNO, N., SODA H, WATANABE M, OKA M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and caecum. **J Natl Cancer Inst**, 87:1876-88, 1995.

INOHARA N, OGURA Y, FONTALBAM A, GUITIERREZ O, PONS F, CRESPO J, *et al.* Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. **J Biol Chem**, 278(8): 5509-12, 2003.

INOHARA N, NUNEZ G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. **Nat Rev Immunol**, 3:371-382, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). Estimativa 2013: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2013.

JARCHUM I, LIU M, SHI CH, ESQUINDA M, PAMER EG. Critical role for MyD88-Mediated Neutrophil Recruitment during *Clostridium difficile* Colitis. **Infection and Immunity**, 80(9): 2989-2996, 2012.

JOHNSTON SD, SMYE M, WATSON RG. Intestinal permeability tests in coeliac disease. **Clin Lab**, 47: 143-150, 2001.

JUSTINO PFC. *Saccharomyces boulardii* reverte à resposta inflamatória e funcional presente na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos. Fortaleza; 2011. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Ceará].

KACZMAREK A, BRINKMAN BM, HEYNDRICKX L, VANDENABEELE P, KRYSKO DV. Severity of doxorubicin-induced small intestinal mucositis is regulated by the TLR-2 and TLR-9 pathways. **J Pathol**, 226: 598-608, 2012.

KAWAI T, AKIRA S. TLR signaling. **Cell Death Differ**, 13: 816-825, 2006.

KANNEGANTI TD, LAMKAMFI M, NUÑEZ G. Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. **Immunity**, 27: 557-559, 2007.

KAWAI T, ADACHI O, OGAWA T, TAKEDA K, AKIRA S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**, 11(1): 115-22, 1999.

KAWAI T, AKIRA S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. **Int Immunol**, 21: 317-337, 2009.

KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update of Toll-like receptors. **Nature Immunology**. 11 (5): 373-384, 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**, 51:4187-91, 1991.

- KEEFE DM, CUMMINS AG, DALE BM, KOTASEK D, ROBB TA, SAGE RE. Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. **Clin Sci (Lond)**, 92(4): 385-9, 1997.
- KEEFE DM, BREALEY J, GOLAND GJ, CUMMINS AG. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**; 47:632-7, 2000.
- KEEFE DMK. Gastrointestinal mucositis: a new biological model. **Support Care Cancer**, 12: 6-9, 2004
- KEEFE DM, GIBSON RJ. Mucosal injury from targeted anti-cancer therapy. **Support Care Cancer**, 15: 483-90, 2007.
- KEEFE, DM *et al.* Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. **Cancer**, 109:820–31, 2007.
- KIRKWOOD KS, BUNNETT NW, MAA J, CASTAGLIOLO I, LIU B, GERARD N, ZACKS J, POTHOUKAKIS C, GRADY EF. Deletion of neutral endopeptidase exacerbates intestinal inflammation induced by Clostridium difficile toxin A. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. 281(2):G544-51, 2001.
- KOIZUMI, F.; KITAGAWA, M.; NEGISHI, T.; ONDA, T.; MATSUMOTO, S.; HAMAGUCHI, T.; MATSUMURA, Y. Novel SN-38–Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. **Cancer Res**, v. 66, n. 20, p. 10048-10056, 2006.
- KURITA A, KADO S, KANEDA N, ONOUE M, HASHIMOTO S, YOKOKURA T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.**, 46(3):211-20, 2000.
- KRYSKO DV, KACZMAREK A, KRYSKO O, HEYNDRIX L, WOZNICKI J, BOGAERT P, CAUWELS A, TAKAHASHI N, MAGEZ S, BACHERT C, VANDENABEELE P. TLR2 and TLR9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. **Cell Death and Differentiation**, 18: 1316-1325, 2011.
- KRISHNAMURTHI SS. DREWS RE, SAVARESE DMF. Enterotoxicity of Chemotherapy agents.http://www.uptodate.com/contents/enterotoxicity-of-chemotherapeutic-agents?source=search_result&search=chemotherapy+induced+diarrhea&selectedTitle=1%7E10. Acessado em 13/03/2013.
- LALLA RV, PILBEAM CC, WALSH SJ, SONIS ST, KEEFE DM, PETERSON DE. Role of the cyclooxygenase pathway in chemotherapy-induced oral mucositis: a pilot study. **Support Care Cancer**, 18(1): 95-103, 2010.
- LANGER, C.J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. **Oncology**, 18 (7): 17-28, 2004.

LEITAO RF, RIBEIRO RA, BELLAGUARDA EA, MACEDO FD, SILVA LR, ORIA RB, VALE ML, CUNHA FQ, BRITO GA. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol.**, 59(5): 603-12, 2007.

LEITAO RF, BRITO GA, ORIA RB, BRAGA-NETO MB, BELLAGUARDA EA, SILVA LR, FREIRE RS, VALE ML, RIBEIRO RA. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterol**, 16: 11-90, 2011.

LIEW FY, XU D, BRINT EK, O'NEILL LAJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. **Nature Rev Immun**, 5: 446-458, 2005.

LIMA AA, LYERLY DM, WILKINS TD, INNES DJ, GUERRANT RL. Effects of Clostridium difficile toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infect Immun*. 56(3): 582-8, 1988.

LIMA AA, SILVA TM, GIFONI AM, et al. Mucosal injury and disruption of intestinal barrier function in HIV-infected individuals with and without diarrhea and cryptosporidiosis in northeast Brazil. **Am J Gastroenterol**; 92:1861-6, 1997

LIMA AA, CARVALHO GH, FIGUEIREDO AA, GIFONI AR, SOARES AM, SILVA EA, GUERRANT RL. Effects of an alanyl-glutamine-based oral rehydration and nutrition therapy solution on electrolyte and water absorption in a rat model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **Nutrition**, 18(6): 458-62, 2002.

LIMA AA, BRITO LF, RIBEIRO HB, MARTINS MC, LUSTOSA AP, ROCHA EM, LIMA NL, MONTE CM, GUERRANT RL. Intestinal barrier function and weight gain in malnourished children taking glutamine supplemented enteral formula. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. 40 (1): 28- 35, 2005.

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

LIMA-JUNIOR RC, FIGUEIREDO AA, FREITAS HC, et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol**; 69(4):931-42, 2012.

LOPES NN, PLAPLER H, CHAVANTES MC, LALLA RV, YOSHIMURA EM, ALVES MT. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expression in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters: evaluation of two low-intensity laser protocols. **Support Care Cancer**; 17:1409-15, 2009.

LOGAN RM, STRINGER AM, BOWEN JM, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DM. Serum levels of NFκB and drug pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol Ther**, 7 (7): 1139-45, 2008a.

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

LUPP C, ROBERTSON ML, WICKHAM ME, SEKIROV I, CHAMPIONO L, *et al.* Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of *Enterobacteriaceae*. **Cell Host Microbe**, 16: 119–129, 2007.

MABRO M, LOUVET C, ANDRÉ T, CAROLA E, GILLES-AMAR V, ARTRU P, KRULIK M, DE GRAMONT A. Bimonthly leucovorin, infusion 5-fluorouracil, hydroxyurea, and irinotecan (FOLFIRI-2) for pretreated metastatic colorectal cancer. **Am J Clin Oncol.** 26(3): 254-8, 2003.

MEDZHITOV R. Toll-like receptor and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, 1; 135-145, 2001.

MELO ML, BRITO GA, SOARES RC, CARVALHO SB, SILVA JV, SOARES PM, VALE ML, SOUZA MH, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol**; 61(5):775-84. 2008.

MEDEIROS CA, WARREN CA, FREIRE R, VIEIRA CA, LIMA BB, VALE ML, RIBEIRO RA, SOUZA MH, BRITO GA. Role of the haem oxygenase/carbon monoxide pathway in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. **J Med Microbiol.** 60(8): 1146-54, 2011.

MEDZHITOV R. Toll like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, 1: 135-145, 2003

MEDZHITOV R, JANEWAY C JR. The Toll receptor family and microbial recognition. **Trends Microbiol.** 8(10):452-6, 2000.

MELICHAR B, ZEZULOVA M. The significance of altered gastrointestinal permeability in cancer patients. **Curr Opin Support Palliat Care**; 5:47-54, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, 55: 55-63, 1983.

MOTA MLS. **Avaliação dos efeitos do agente citoprotetor amifostina na mucosite oral e disfunção da barreira intestinal: modelos experimentais em ratos e em pacientes portadores de câncer submetidos à quimioterapia.** Fortaleza; 2004. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará].

MCGETTRICK AF, O'NEILL LAJ. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion in Immunology**, 22(1): 20-7, 2010.

NAKAO T, KURITA N, KOMATSU M, YOSHIKAWA K, IWATA T, UTUSNOMIYA T, SHIMADA M. Irinotecan injures tight junction and causes bacterial translocation in rat. **J Surg Res.** 173(2):341-7, 2012.

NEVIERE R, PARSONS PE, HOLLINGSWORTH H. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome: Definitions, epidemiology, and prognosis. www.uptodate.com. Acessado em 19/03/2013.

NETEA MG, VAN DEUREN M, KULLBERG BJ, CAVAILLON JM, VAN DER MEER JW. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?. **Trends Immunol**, 23(3): 135-9, 2003.

O'NEIL LA, BOWIE AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-Like receptor signalling. **Nat Rev Immunol**, 7(5):353-64, 2007.

PARK BS, SONG DH, KIM HM, CHOI BS, LEE H, LEE JO. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD2 complex. **Nature**, 458 (7242): 1191-5, 2009.

PEREZ, E.A.; HILLMAN, D.W.; MAILLIARD, J.A.; INGLE, J.N.; RYAN, J.M.; FITCH, T.R.; ROWLAND, K.M.; KARDINAL, C.G.; KROOK, J.E.; KUGLER, J.W.; DAKHIL, S.R. Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline, a taxane, or both. **J Clin Oncol**, 22 (14): 2849-2855, 2004.

PESSINO A, SOBRERO A. Optimal treatment of metastatic colorectal cancer. **Expert Rev Anticancer Ther.** 6(5):801-12, 2006.

PICO JL, AVILA-GAVARITO A, NACCACHE P. Mucositis: its occurrence, consequences, and treatment in the oncology setting. **The oncologist**, 3: 446-51, 1998.

PODOLSKY DK. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, 347: 417-429, 2002.

QUARONI A, WANDS J, TRELSTAD RL, ISSELBACHER KJ. Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. **J Cell Biol.** 80(2): 248-65, 1979.

RAM R, FARBMAN L, LEIBOVICI L, RAANANI P, YESHURUN M, VIDAL L, GAFTER-GVILI A, PECK A, SHPILBERG O, PAUL M. Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalised haemato-oncological patients. **Int J Antimicrob Agents**, 40(2): 123-6, 2012.

RAKOFF-NAHOUM S, HAO L, MEDZHITOV R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. **Immunity**, 25: 319-329, 2006.

RIBEIRO RA. **Mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese de efeitos coletarais da quimioterapia do Câncer**. Fortaleza, 2011. [Memorial para Prof. Titular – Universidade Federal do Ceará].

RIBEIRO RA, FREITAS HC, CAMPOS MC, SANTOS CC, FIGUEIREDO FC, BRITO GA, CUNHA FQ. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J Urol.** 167(5): 2229-34, 2002.

RIBEIRO RA, LIMA-JUNIOR RCP, LEITE CAVG, MOTA JM SC, MACEDO FYB, LIMA MVA, BRITO GAC. Chemotherapy-induced hemorrhagic cystitis: pathogenesis, pharmacological approaches and new insights. **J Exp Integr Med;** 2(2): 95-112, 2012.

RIBRAG V, KOSCIELNY S, VANTELON JM, FERMÉ C, RIDELLER K, CARDE P, BOURHIS JH, MUNCK JN. Phase II trial of irinotecan (CPT-11) in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma.** 44(9): 1529-33, 2003.

RICHARDSON G, DOBISH R. Chemotherapy induced diarrhea. **J Oncol Pharm Pract.** 13(4):181-98, 2007.

RIVORY LP, HAAZ MC, CANAL P *et al.* Pharmacokinetic interrelationships of irinotecan (CPT-11) and its three major plasma metabolites in patients enrolled in phase I/II trials. **Clin Cancer Res;** 3: 1261–1266, 1997.

ROCHA MF, SOARES AM, RIBEIRO RA, LIMA AA. Absence of intestinal secretion on supernatants from macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin B on rabbit ileum. **Toxicon.** 39(2-3): 335-40, 2001.

ROCHA MFG, AGUIAR JEP, SIDRIM JJC, COSTA RB, FEITOSA RFG, RIBEIRO RA, LIMA AAM. Role of mast cells and pro-inflammatory mediators on intestinal secretion induced by cholera toxin. **Toxicon,** 42: 183-189, 2003.

ROCHA-LIMA, C.M.; GREEN, M.R.; ROTCHE, R.; MILLER, W.H JR; JEVREY, G.M.; CISAR, L.A.; MORGANTI, A.; ORLANDO, N.; GRUIA, G.; MILLER, L.L. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. **J Clin Oncol,** 22: 18-21, 2004.

ROTHENBERG ML, OZA AM, BIGELOW RH, BERLIN JD, MARSHALL JL, RAMANATHAN RK, HART LL, GUPTA S, GARAY CA, BURGER BG, LE BAIL N, HALLER DG. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. **J Clin Oncol.** 21(11):2059-69, 2003.

RUBENSTEIN EB1, PETERSON DE, SCHUBERT M, KEEFE D, MCGUIRE D, EPSTEIN J, ELTING LS, FOX PC, COOKSLEY C, SONIS ST. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer,** 100 (9): 2016-46, 2004.

SANCHO E, BATTLE E, CLEVERS H. Signalling pathways in intestinal development and cancer. **Nat Rev Cell Dev Biol,** 20:695-723, 2004.

SALIBA F, HAGIPANTELLI R, MISSET JL, *et al.* Pathophysiology and therapy of irinotecano induced delayed-onset diarrhoea in patients with advanced colorectal cancer: a prospective assessment. **J Clin Oncol**, 16: 2745-51, 1998.

SALTZ LB, COX JV, BLANKE C, ROSEN LS, FEHRENBACHER L, MOORE MJ, MAROUN JA, ACKLAND SP, LOCKER PK, PIROTTA N, ELFRING GL, MILLER LL. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. **N Engl J Med.**, 28;343(13):905-14, 2000.

SALTZ L. Oral chemotherapy for colorectal cancer: some economic considerations. **Oncology** (Williston Park). 15 (1 Suppl 2): 29-32, 2001.

SEZER A, USTA U, CICIN I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. **Med Oncol**. 26(3):350-7, 2009.

SILVA AC, SANTOS-NETO MS, SOARES AM, FONTELES MC, GUERRANT RL, LIMA AA. Efficacy of a glutamine-based oral rehydration solution on the electrolyte and water absorption in a rabbit model of secretory diarrhea induced by cholera toxin. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. 26(5):513-9, 1998.

SOARES PM. **Mucosite experimental induzida por 5-fluorouracil: papel de IL-1 β , IL-4, PAF e avaliação das alterações da motilidade digestiva.** Fortaleza, 2008. [Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará].

SOARES PM, LIMA-JUNIOR RC, MOTA JM, *et al.* Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**; 68:713-20, 2011.

SONIS ST. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**. 4(4):277–284, 2004.

SONIS ST, ELTING LS, KEEFE D, PETERSON DE, SCHUBERT M, HAUER-JENSEN M, BEKELE BN, RADER-DURLACHER J, DONNELLY JP, RUBENSTEIN EB. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, 100(9):1995-2025, 2004.

SONIS ST. New thoughts on the initiation of mucositis. **Oral Dis**; 16:597-600, 2010.

SCULLY C, SONIS S, DIZ PD. Oral mucositis. **Oral Dis.**, 12(3): 229-241, 2006.

SCHULZ C, BOECK S, HEINEMANN V, STEMMLER HJ. UGT1A1 genotyping: a predictor of irinotecan-associated side effects and drug efficacy? **Anticancer Drugs**; 20:867-79, 2009.

SMITH, F. P.; KISNER, D. L.; WIDERLITE, L.; SCHEIN, P. S. Chemotherapeutic alteration of small intestinal morphology and function: a progress report. **J Clin Gastroenterol**, 1 (3): 203-207, 1979.

SCHMITZ J, OWYANG A, OLDHAM E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, 23:479-90, 2005.

SCHMITTEL A, JAHNKE K, THIEL E, KEILHOLZ U. Neomycin as secondary prophylaxis for irinotecan-induced diarrhea. **Ann Oncol**; 15:1296, 2004.

SLACK JL *et al.* Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. **J. Biol. Chem.** 275: 4670-4678, 2000.

SLATTER JG, SCHAAF LJ, SAMS JP, et al. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients. **Drug Metab Dispos**; 28:423-33, 2000.

SPILLER F, ORRICO MI, NASCIMENTO DC, CZAIKOSKI PG, SOUTO FO, ALVES-FILHO JC, FREITAS A, CARLOS D, MONTENEGRO MF, NETO AF, FERREIRA SH, ROSSI MA, HOTHERSALL JS, ASSREUY J, CUNHA FQ. Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K⁺ATP channel activation. **Am J Respir Crit Care Med**; 182(3):360-8, 2010.

STRINGER AM, GIBSON RJ, BOWEN JM, LOGAN RM, YEOH AS, KEEFE DM. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. **J Support Oncol**; 5:259-67, 2007a.

STRINGER, A.M.; GIBSON, R.J.; LOGAN, R.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.; BURNS, J.; KEEFE, D.M. Chemotherapy-induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. **Exp Biol Med**, 232 (1): 96-106, 2007b.

STRINGER AM, GIBSON RJ, LOGAN RM, BOWEN JM, YEOH ASJ, KEEFE DMK. Faecal microflora and beta-glucuronidase expression are altered in an irinotecano-induced diarrhea model in rats. **Cancer Biol Ther**, 7(12): 1919-25, 2008.

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

STRINGER AM, GIBSON RJ, BOWEN JM, KEEFE DMK. Chemoterapy-induced modifications to gastrointestinal microbiota: evidence and implications of change. **Curr Drug Metab**, 10:79-83, 2009b.

SRIKRISHNA G, FREEZE HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. **Neoplasia**; 11:615-28, 2009.

TADA H, AIBA S, SHIBATA K, OHTEKI T, TAKADA H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. **Infect Immun**, 73(12): 7967-76, 2005.

TALLMAN, M.N.; RITTER, J.K.; SMITH, P.C. Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. **Drug Metab Dispos**. 33 (7): 977-83, 2005.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; HIROHASHI, M.; KATO, M.; NOMURA, M.; NAGAI, E.; YOKOI, T.; KAMATAKI, T. Involvement of β -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative Irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res**, 56: 3752-3757, 1996.

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

TAKEDA K, KAISHO T, AKIRA S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol**, 21: 335-76, 2003.

TAKEUCHI O, TAKEDA K, HOSHINO K, ADACHI O, OGAWA T, AKIRA S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. **International Immunology**, 12(1):113-7, 2000.

TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, 140(6):805-20, 2010.

TAO W, DEYO DJ, TRABER DL, JOHNSTON WE, SHERWOOD ER. Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice. **Shock**. 21(1):31-7, 2004.

TEPPER RE, SIMON D, BRANDT LJ, NUTOVITS R, LEE MJ. Intestinal permeability in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Am J Gastroenterol**, 89:878-82. 1994.

THOMAS KE, SAPONE A, FASANO A, VOGEL SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. **J Immunol**, 176: 2512-2521, 2006.

TREVELIN SC, ALVES-FILHO JC, SÔNEGO F, TURATO W, NASCIMENTO DC, SOUTO FO, CUNHA TM, GAZZINELLI RT, CUNHA FQ. Toll-like receptor 9 activation in

neutrophils impairs chemotaxis and reduces sepsis outcome. **Crit Care Med**; 40(9): 2631-7, 2012.

TRIFAN OC, DURHAM WF, SALAZAR VS, HORTON J, LEVINE BD, ZWEIFEL BS, DAVIS TW, MASFERRER JL. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Res**. 15; 62(20):5778-84, 2002.

TSUJI E, HIKI N, NOMURA S, FUKUSHIMA R, KOJIMA J, OGAWA T, MAFUNE K, MIMURA Y, KAMINISHI M. Simultaneous onset of acute inflammatory response, sepsis-like symptoms and intestinal mucosal injury after cancer chemotherapy. **Inter. J. Cancer**, 107: 303-308, 2003.

TSUKITA S, FURUSE M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. **Curr Opin Cell Biol**. 14(5):531-6, 2002.

UEHARA A, TAKADA H. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. **J Dent Res**, 87(7): 682-6, 2008.

UEMATSU S, JANG MH, CHEVRIER N, GUO Z, KUMAGAI Y, YAMAMOTO M, KATO H, SOUGAWA N, MATSUI H, KUWATA H, HEMMI H, COBAN C, KAWAI T, ISHII KJ, TAKEUCHI O, MIYASAKA M, TAKEDA K, AKIRA S. Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. **Nat Immunol**, 7: 868-874, 2006.

UEMATSU S, AKIRA S. Toll-like Receptors and Type I Inteférons. **J. Biol. Chem.**, 282: 15319-15323, 2007.

VIANA CF, MELO DH, CARNEIRO-FILHO BA, MICHELIN MA, BRITO GA, CUNHA FQ, LIMA AA, RIBEIRO RA. Pro-inflammatory effects of cholera toxin: role of tumor necrosis factor alpha. **Toxicon**, 40(10): 1487-94, 2002.

VIELE CS. Overview of chemotherapy-induced diarrhea. **Semin Oncol Nurs**. 19(4 Suppl 3):2-5, 2003.

VOGELSANG H, SCHWARZENHOFER M, OBERHUBER G. Changes in gastrointestinal permeability in celiac disease. **Dig Dis**; 16:333-6, 1988.

WALL ME, WANI MC, COOK CE, et. al. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata. **J Am Chem Soc**. v. 88, n. 16, p. 3888-3890, 1966.

-
- WADLER S, SCHWARTZ EL. Chemotherapy for colorectal carcinoma: observations regarding recent clinical trials using biochemical modulation. **J Clin Oncol**, 13(10): 2626-7, 1995.
- WAGNER H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. **Curr Opin Microbiol**, 5(1): 62-9, 2002.
- WANG JC. DNA Topoisomerases. **Annu Rev. Biochem**, 65:635-92, 1996.
- WANG T, CAI G, QIU Y, FEI N, ZHANG M, *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. **ISME J**, 6: 320-329, 2012.
- WARREN CA, CALABRESE GM, LI Y, PAWLOWSKI SW, FIGLER RA, RIEGER J, ERNST PB, LINDEN J, GUERRANT RL. Effects of adenosine A_{2A} receptor activation and alanyl-glutamine in *Clostridium difficile* toxin-induced ileitis in rabbits and cecitis in mice. **BMC Infect Dis**. 20: 12 -13, 2012.
- WOO PC, NG WF, LEUNG HC, TSOI HW, YUEN KY. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacol Res**. 41(5):527-32, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 19 fev. 2013.
- WU ZQ, HAN XD, WANG Y, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemother Pharmacol** 68:87-96, 2011.
- YAMAMOTO M, SATO S, HEMMI H, HOSHINO K, KAISHO T, SANJO H, *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**, 301(5633):640-3, 2003.
- YEOH AS, GIBSON RJ, YEOH EE, BOWEN JM, STRINGER AM, GIAM KA, KEEFE DM. A novel animal model to investigate fractionated radiotherapy-induced alimentary mucositis: the role of apoptosis, p53, nuclear factor-kappaB, COX-1, and COX-2. **Mol Cancer Ther**. 6(8): 2319-27, 2007.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n°99/2010, sobre o projeto intitulado”. **“ESTUDOS DOS MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DA BARREIRA INTESTINAL E INTERAÇÃO LEUCÓCITO-ENDOTÉLIO NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO (CPT-11)”** de responsabilidade do Professor RONALDO DE ALBURQUERQUE RIBEIRO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 29 de agosto de 2011.

Fortaleza, 11 de outubro de 2011.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA