



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

LUCAS DE LIMA CARVALHO

**INIBIÇÃO DO mTOR AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO**

FORTALEZA-CE

2016

LUCAS DE LIMA CARVALHO

**INIBIÇÃO DO mTOR AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Coorientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Deysi Viviana Tenazoa Wong

FORTALEZA-CE

2016



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C325i Carvalho, Lucas de Lima.  
INIBIÇÃO DO mTOR AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO / Lucas de Lima Carvalho. – 2016.  
118 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.  
Coorientação: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong.

1. mTOR. 2. Rapamicina. 3. Everolimo. 4. Células de Paneth. 5. Mucosite intestinal. I.  
Título.

CDD 615.1

---

LUCAS DE LIMA CARVALHO

**INIBIÇÃO DO mTOR AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em 21/10/2016

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior  
Universidade Federal do Ceará- UFC

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lilia Maria Carneiro Câmara  
Universidade Federal do Ceará- UFC

---

Prof. Dr. Guilherme Rabelo de Souza  
Universidade de São Paulo – USP/Ribeirão Preto

Dedico este trabalho ao mestre por vocação Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (*in memoriam*) que além de professor tornou-se meu amigo e que carinhosamente me recebeu tão bem em seu laboratório tornando-o extensão da minha casa e me ensinou como realizar pesquisa sobremodo excelente alinhando companheirismo e seriedade. Também dedico esta obra à toda sua família de sangue e do meio acadêmico (que não são poucos).

## AGRADECIMENTOS

Nesta seção não pouparei palavras de agradecimentos, tamanha minha gratidão à todos que estiveram comigo durante essa caminhada.

Gratidão primeiro à Deus, autor e consumidor da minha fé, que tornou todo este sonho possível me colocando sempre no melhor caminho ladeado pelas melhores pessoas.

Aos meus pais Neto e Arleziana por todo o cuidado que tiveram na criação dos seus filhos ensinando-os valores sólidos eternos e que dessa forma permitiram a construção de um bom caráter.

Aos meus irmãos Talita e João Luís pelo companheirismo e carinho de todas as horas.

À toda minha família representada por meus avós, tios e primos que são expansão do amor de Deus por mim e referência de gentileza e compreensão.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, que desde os tempos de graduação me contagiava (e a todos os alunos) pela alegria e clareza que partilhava dos ensinamentos de farmacologia e que sem saber me motivou a trilhar esse caminho nobre da ciência. Agradeço demais pela excelente orientação neste trabalho e pela referência do ser humano que é. À você minha gratidão e admiração, professor.

À minha amada coorientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deysi Viviana Tenazoa Wong, Peruana mais Brasileira que conheço, por toda a paciência em me conduzir diligentemente passo a passo nos caminhos científicos de maneira irrepreensível, pelo exemplo de mãe, competência e dedicação, pela participação efetiva neste trabalho e o mais importante de tudo, pela sua amizade que para mim foi base para seguir em frente e concluir esta jornada com êxito.

À Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Lima Vale pela partilha do dia-a-dia no laboratório que se tornou muito proveitosa, principalmente nos encontros musicais do LAFICA e *Jam sessions* do PET-Medicina. Obrigado professora!

Ao Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes de Souza pelo inestimável prestígio e convivência durante esses anos de mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelas disciplinas ministradas, seminários ou até mesmo pelos encontros casuais nos corredores dos departamentos. Em especial à Prof<sup>a</sup>. Geanne Matos de Andrade pela gestão enquanto fui aluno do mestrado pela boa condutância desta Pós-graduação e pelas significativas contribuições na banca de qualificação. Da mesma forma agradeço a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Teresinha de Brito pelas

considerações na banca de qualificação. Tenho certeza que as observações e sugestões de vocês serviu para engrandecer, e muito, este trabalho.

Assim também agradeço ao Dr. Guilherme Rabelo de Souza e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lilia Maria Carneiro Câmara pela excelente contribuição na banca desta dissertação que sobremaneira serviu para engrandecer e dar uma nova perspectiva para este trabalho.

Também ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, atual coordenador do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, com quem tive a oportunidade de publicar meu primeiro trabalho de divulgação da ciência intitulado “A insignificante leveza de ser...mosca”. Muito obrigado professor, isso fez muita diferença para mim enquanto aluno!

Aos pós-graduandos e amigos do LAFICA: Ana Paula Macedo, Anielle Torres, Camila Fernandes, Camila Meirelles, Carlos Wagner, Daniel Gurgel, Larisse Lucetti, Livia Mourão, Livia Nobre, Lucas Nicolau, Maraíza Teixeira, Venúcia Magalhães e Renata Falcão pelo companheirismo, pronta disponibilidade no auxílio dos experimentos e pela partilha dos momentos alegres e tristes vividos dentro e fora do laboratório. Se vocês não existissem teriam que ser inventados de qualquer forma. Amo vocês!

Aos bolsistas de iniciação científica que muito me ajudaram, principalmente Gabi (Gabriela Ponte) e também HG (Rafael González). Vocês foram fundamentais neste trabalho não apenas pelo auxílio prestado nos experimentos, mas pela amizade de vocês que levo com muito carinho.

Também à Lethícia Prado (quase doutora hehe) e ao agora Dr. Diego Holanda pela amizade que tenho muito prestígio! valeu Didi e Lelê, admiro muito vocês!

Aos colegas de pós-graduação pelas partidas de futebol, saídas, confraternizações e troca de experiências. Foi de muita valia tê-los conhecido! A vida segue e certamente os relacionamentos permanecerão!

Às técnicas de laboratório, especialmente aquela que é matriarca desta função no LAFICA desempenhando um papel tão nobre quanto vital, Maria Silvandira França Pinheiro (Vandinha). Mas também à Dona Eli, Dona Denilde, Jaqueline Viana e Maria Socorro França pela imensa colaboração mesmo nos mínimos detalhes deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pela indispensável ajuda na manutenção das atividades do departamento, bem como aos funcionários do Centro de Biomedicina e Biotério Setorial, além dos funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos.

Aos meus professores do ensino fundamental, médio e graduação pelo conhecimento passado e que tornaram possível chegar até aqui, em especial às professoras do curso de Farmácia da

UFC Prof<sup>a</sup> Maria de Fátima Oliveira, Prof<sup>a</sup> Maria Augusta Drago Ferreira e Prof<sup>a</sup> Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho pelo cuidado e atenção que tiveram comigo em um momento muito delicado que passei em 2011, serei sempre grato à Deus pela vida de vocês! É como diz a famigerada frase de Isaac Newton: “Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”.  
Ao Comitê de Ética no Uso de Animais, pela concessão deste trabalho científico.  
Ao CNPq, pelo suporte financeiro e por tornar possível que este trabalho fosse desenvolvido.

À todos estes supracitados o meu muito obrigado e dever de retribuir em vida o meu melhor como profissional!

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.”

Provérbios 16:3 (NVI)

## RESUMO

**INTRODUÇÃO.** O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais prevalentes em todo o mundo, sendo uma das principais causas de óbito por câncer. No Brasil, apresenta-se como o terceiro câncer mais frequente nos homens e segundo nas mulheres. Nas últimas décadas novas drogas incorporadas à protocolos clínicos para o tratamento do CCRm tem proporcionado um aumento significativo na sobrevida de pacientes com esse tipo de malignidade. Dentre estas drogas o irinotecano ocupa lugar de destaque e é comumente utilizado como primeira linha no tratamento do CCR metastático. Entretanto, como todo tratamento quimioterápico há um ônus, um quarto dos pacientes em tratamento com irinotecano apresentam uma grave mucosite intestinal como efeito colateral mais notório. A desregulação de vias de sinalização celular certamente é uma das principais razões para o desenvolvimento do câncer. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é responsável pelo crescimento celular e o eixo compreendido por PI3K/Akt/mTOR está frequentemente desregulada em vários tipos de câncer. Dessa forma, esse trabalho focou em investigar o papel do mTOR durante a mucosite intestinal experimental induzida pelo irinotecano. **MÉTODOS.** Camundongos machos C57BL/6 (n=6/grupo) foram administrados intraperitonealmente com salina ou irinotecano (75 mg/kg ou 45 mg/kg) durante quatro dias consecutivos e tratados com rapamicina ou everolimo (inibidores de mTOR, 1,5 mg/kg e 3 mg/kg, respectivamente) seguidos da administração de irinotecano. Periodicamente foram avaliados a variação de peso corpóreo e escores para avaliação do grau de diarreia. Após a eutanásia dos animais, amostras de íleo foram coletadas para determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO), histopatologia e análise morfométrica e dosagem dos níveis de citocinas [KC (quimiocina análoga da IL-8 humana), IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ ]. A expressão gênica do RNAm das proteínas da via PI3K/Akt/mTOR foi realizada por qRT-PCR. Também foi colhido sangue dos animais para avaliação da contagem total de leucócitos. Os testes de ANOVA/Bonferroni ou Kruskal-Wallis/Dunn foram usados para as análises estatísticas.  $P < 0,05$  foi aceito como significativo. O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da UFC (número de protocolo N°100/14). **RESULTADOS.** Os animais injetados com irinotecano 75 mg/kg apresentaram um aumento na expressão gênica do RNAm de PI3K, Akt e mTOR evidenciando a participação da via na iatrogenia. O irinotecano 75 mg/kg reduziu significativamente o peso corpóreo, contagem total de leucócitos, razão vilo/crípta e promoveu uma lesão intestinal que lhe é característico quando comparado ao grupo controle salina. Além disso, de forma geral, a inibição do mTOR com rapamicina ou everolimo agravou a maioria desses parâmetros, tais como perda de peso, diarreia, histopatologia, infiltração de neutrófilos e mediadores inflamatórios como TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ . **CONCLUSÃO.** A inibição do mTOR agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano provavelmente pelo aumento da resposta pro-inflamatória via TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  com participação importante das Células de Paneth. Apoio financeiro: CNPq.

**Palavras-chave:** Irinotecano, Mucosite Intestinal, mTOR, Rapamicina, Everolimo, Células de Paneth

## ABSTRACT

### **mTOR INHIBITION ENHANCES IRINOTECAN-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS**

**INTRODUCTION.** Colorectal cancer (CRC) is one of the most prevalent cancers worldwide and is a leading cause of death from cancer. In Brazil, it is the third most frequent cancer in men and second in women. In the last decades new drugs incorporated into the clinical protocols for the treatment of mCRC have provided a significant increase in the survival of patients with this type of malignancy. Among these drugs, irinotecan occupies a prominent place and is commonly used as the first line in the treatment of metastatic mCRC. However, since all chemotherapy treatments have a burden, a quarter of patients receiving irinotecan present a severe intestinal mucositis as a more noticeable side effect. Deregulation of cell signaling pathways is certainly one of the main reasons for the development of cancer. The mammalian target of rapamycin (mTOR) is responsible for cell growth and the axis PI3K/Akt/mTOR is often dysregulated in various cancers. Thus, this work focused on investigating the role of mTOR during experimental irinotecan-induced intestinal mucositis. **METHODS.** Male mice C57BL/6 (n=6/group) were administered intraperitoneally with saline or irinotecan (75 mg/kg or 45 mg/kg) for four consecutive days and treated with rapamycin or everolimus (mTOR inhibitors, 1.5 mg/kg and 3 mg/kg, respectively) followed by administration of irinotecan. After animals's euthanasia, ileum samples were collected for determination of myeloperoxidase activity (MPO), histopathology and morphometric analysis, cytokine levels [KC (Human IL-8 analogous chemokine), IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$ ]. The gene expression of the mRNA of the proteins of the PI3K/Akt/mTOR was performed by qRT-PCR. Also, animals's blood samples was collected for evaluation of total leukocyte blood count. The ANOVA test/Bonferroni or Kruskal-Wallis/Dunn were used for statistical analysis.  $P < 0.05$  was considered significant. This study was approved by the ethics committee of the UFC (number of protocol N $^{\circ}$ 100/14). **RESULTS.** Animals injected with irinotecan 75 mg/kg showed an increase in gene mRNA expression of PI3K, Akt and mTOR showing the participation in this iatrogenia. Irinotecan 75 mg/kg significantly reduced body weight, total leukocyte count, villus/crypt ratio and promoted an intestinal injury that it is characteristic when compared to the saline control group. Furthermore, in general, inhibition of mTOR by rapamycin or everolimus worsened most of these parameters, such as weight loss, diarrhea, histopathology, neutrophil infiltration and inflammatory mediators such as TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$ . **CONCLUSION.** Inhibition of mTOR aggravates the intestinal mucositis induced by irinotecan likely to increase pro-inflammatory response by TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$  with remarkable participation of Paneth Cells. Financial support: CNPq.

**Keywords:** Irinotecan, Intestinal Mucositis, mTOR, Rapamycin, Everolimus, Paneth cells

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BPs	Proteínas de ligação 4E do fator de alojamento cariótico
5-FU	5-Fluoruracil
Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de Variância
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
Anti-EGFR	Anticorpo contra o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
Anti-VEGF	Anticorpo contra o Fator de Crescimento Endotelial Vascular
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CCR	Câncer Colorretal
CCRM	Câncer Colorretal Metastático
CPT-11	Irinotecano
CYP3A4	Isoenzima do Citocromo P450
DAMP	Padrão Molecular Associado ao Dano
Deptor	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DSS	Dextrana Sulfato de Sódio
cDNA	DNA complementar
eIF4E	Fator de Iniciação da Tradução Eucariótico 4E
EVE	Everolimo
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKBP12	<i>FK binding protein 12 kDa</i>
FRB	<i>FKBP12-rapamycin binding Domain</i>

HE	Hematoxilina-Eosina
HIF-1	Fator 1-alfa induzido por hipóxia
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-1ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-18bp	Proteína ligante da interleucina 18
IL-33	Interleucina 33
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
IRI	Irinotecano
ISOO	<i>International Society of Oral Oncology</i>
KC	Quimiocina análoga à IL-8 humana em camundongos
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LPS	Lipopolissacarídeo
mIAS	Estomatite relacionada aos inibidores de mTOR
MASCC	<i>Multinational Association of Supportive Care in Cancer</i>
MI	Mucosite intestinal
MO	Mucosite Oral
MPO	Mieloperoxidase
mLST8	<i>Mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
mTORC1	Complexo 1 do mTOR
mTORC2	Complexo 2 do mTOR
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>

NF- $\kappa$ B	Fator de Transcrição Nuclear kappa
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Orto-fenilenediamina
PAMP	Padrão Molecular Associado à Patógeno
PIKK	Quinases relacionadas ao fosfoinositídeo-quinases
PI3K	Fosfoinositídeo-3-quinase
PRAS40	<i>Proline-rich AKT1 substrate 1</i>
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
qRT-PCR	PCR em Tempo Real Quantitativo
QT	Quimioterapia
RAP	Rapamicina
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
Rictor	<i>Rapamycin-insesitive companion of mTOR</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
S6K1	Quinase beta-1 dos reguladores de tradução S6 ribossômico
SN-38	Metabólito Ativo do Irinotecano
SN-38G	SN-38 conjugado
TGF- $\beta$	Fator de Transformação do Crescimento beta
Th1	Linfócitos T helper 1
TNF- $\alpha$	Fator alfa de necrose tumoral
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TSC	Esclerose Tuberosa
UGT1A	Uridina Difosfato Glicosiltransferase 1A

### TABELA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	A incorporação de novas drogas nas últimas 3 décadas tem contribuído para um aumento na sobrevivência dos pacientes com CCRm.....	24
<b>FIGURA 2.</b>	Estrutura Química da camptotecina e derivados.....	26
<b>FIGURA 3.</b>	Metabolismo do Irinotecano (CPT-11).....	27
<b>FIGURA 4.</b>	Mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal por irinotecano.....	31
<b>FIGURA 5.</b>	Unidades protéicas formadoras do mTORC1 e mTORC2.....	32
<b>FIGURA 6.</b>	Via de sinalização do mTOR.....	34
<b>FIGURA 7.</b>	Estrutura química da Rapamicina e Everolimo.....	36
<b>FIGURA 8.</b>	Sinalização celular via TLR/MyD88/mTOR.....	43
<b>FIGURA 9.</b>	Esquema do Protocolo experimental utilizado.....	48
<b>FIGURA 10.</b>	Escores para diarreia.....	50
<b>FIGURA 11.</b>	Esquema da análise morfométrica.....	51
<b>FIGURA 12.</b>	Esquema do ensaio de MPO.....	52
<b>FIGURA 13.</b>	Esquema do ensaio de ELISA.....	49
<b>FIGURA 14.</b>	Irinotecano aumenta a expressão do RNAm do eixo PI3K/Akt/mTOR no íleo de camundongos C57BL/6.....	58
<b>FIGURA 15.</b>	Irinotecano e os inibidores de mTOR induzem perda ponderal em camundongos C57BL/6.....	60
<b>FIGURA 16A.</b>	Irinotecano aumenta os escores de diarreia em camundongos C57BL/6 e a inibição do mTOR com rapamicina tende a agravar este parâmetro (5 dias).....	62
<b>FIGURA 16B.</b>	Irinotecano aumenta os escores de diarreia em camundongos C57BL/6 e a inibição do mTOR com everolimo tende a agravar este parâmetro (7 dias).....	64
<b>FIGURA 16C.</b>	Irinotecano aumenta os escores de diarreia em camundongos C57BL/6 (7 dias).....	65
<b>FIGURA 17.</b>	Irinotecano 75 mg/kg promove lesão intestinal em camundongos C57BL/6.....	67
<b>FIGURA 18.</b>	Irinotecano aumenta os escores histopatológicos no íleo de camundongos C57BL/6.....	69

<b>FIGURA 19.</b>	Irinotecano 75 mg/kg altera a morfometria em íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal.....	71
<b>FIGURA 20.</b>	O everolimo promove uma exacerbação da lesão observado na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg no íleo de camundongos C57BL/6.....	73
<b>FIGURA 21.</b>	Everolimo aumenta os escores histopatológicos na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg no íleo de camundongos C57BL/6.....	75
<b>FIGURA 22.</b>	Everolimo intensifica o dano estrutural na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg no íleo de camundongos C57BL/6.....	77
<b>FIGURA 23.</b>	Everolimo induziu hipertrofia de células de Paneth no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal por irinotecano 75 mg/kg em 7 dias.....	79
<b>FIGURA 24.</b>	Everolimo não alterou os escores histopatológicos na dose padrão de irinotecano 75 mg/kg no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal.....	80
<b>FIGURA 25.</b>	Everolimo não altera o aspecto morfométrico no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal com irinotecano 75 mg/kg.....	82
<b>FIGURA 26.</b>	Irinotecano e inibidores de mTOR causam leucopenia em camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal.....	84
<b>FIGURA 27.</b>	Irinotecano 75 mg/kg e everolimo numa sub-dose de irinotecano 45 mg/kg aumentam a atividade de MPO no íleo de camundongos C57BL/6	86
<b>FIGURA 28.</b>	Irinotecano 75 mg/kg em combinação com inibidores de mTOR aumentam o nível de citocinas inflamatórias no íleo de camundongos C57BL/6.....	88
<b>FIGURA 29.</b>	Modelo hipotético da modulação farmacológica da inibição do mTOR na mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	102

### LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	Prevalência de lesão na mucosa oral associada com o uso de inibidores de mTOR.....	38
<b>TABELA 1.</b>	Sequência de primers <i>Mus musculus</i> obtidos no Banco de dados do NCBI.....	54
<b>TABELA 2.</b>	Avaliação da diarreia em animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano e tratados com rapamicina (5 dias).....	62
<b>TABELA 3.</b>	Avaliação da diarreia em animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano e tratados com everolimo na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg (7dias).....	64
<b>TABELA 4.</b>	Avaliação da diarreia em animais submetidos a mucosite intestinal na dose padrão de irinotecano e tratados com everolimo (7 dias).....	65
<b>TABELA 5.</b>	Avaliação histopatológica de animais submetidos a mucosite intestinal com irinotecano 75 mg/kg e tratados com rapamicina (5 dias).....	69
<b>TABELA 6.</b>	Avaliação histopatológica de animais submetidos a mucosite intestinal e tratados com everolimo na sub-dose de irinotecano (7dias).....	75
<b>TABELA 7.</b>	Avaliação histopatológica de animais submetidos a mucosite intestinal e tratados com everolimo (7dias).....	80

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>1.1 Irinotecano</b> .....	25
<b>1.2 Mucosite Intestinal</b> .....	28
<b>1.3 mTOR</b> .....	32
<b>1.4 Inibidores de mTOR</b> .....	34
<b>1.4.1. Rapamicina</b> .....	34
<b>1.4.2. Everolimo</b> .....	37
<b>1.5 Justificativa</b> .....	42
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	45
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	45
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	45
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	47
<b>3.1 Animais</b> .....	47
<b>3.2 Drogas</b> .....	47
<b>3.3 Protocolo Experimental</b> .....	47
<b>3.3.1 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano e tratamento com os inibidores de mTOR</b> .....	47
<b>3.4 Parâmetros a serem avaliados na Mucosite Intestinal</b> .....	49
3.4.1 <i>Análise da variação de massa corpórea</i> .....	49
3.4.2 <i>Avaliação de parâmetro hematológico</i> .....	49
3.4.3 <i>Avaliação do grau da diarreia apresentada</i> .....	49
3.4.4 <i>Análise histopatológica e morfométrica da mucosite intestinal</i> .....	50
3.4.5 <i>Ensaio de mieloperoxidase (MPO)</i> .....	51
3.4.6 <i>Dosagem de citocinas</i> .....	52
3.4.7 <i>Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) para a via PI3K/Akt/mTOR</i> .....	53
<b>3.5 Análise estatística</b> .....	55
<b>4 RESULTADOS</b> .....	57
<b>4.1 EXPRESSÃO GÊNICA DO RNAm DA VIA PI3K/Akt/mTOR NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO IRINOTECANO</b> .....	57
<b>4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DA MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO</b> .....	59
<b>4.2.1. ANÁLISE DA VARIAÇÃO PONDERAL</b> .....	59
<b>4.2.2. ANÁLISE DOS ESCORES PARA DIARREIA</b> .....	61
<b>4.2.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO</b> .....	66

4.2.4. AVALIAÇÃO DA CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS.....	83
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS DA MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO .....	85
4.3.1. EFEITO DO IRINOTECANO E INIBIDORES DE mTOR SOBRE A ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE EM CAMUNDONGOS C57BL/6.....	85
4.3.1. EFEITO DO IRINOTECANO E INIBIDORES DE mTOR SOBRE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 .....	87
5 DISCUSSÃO .....	91
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	104
7 REFERÊNCIAS .....	106



---

# INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

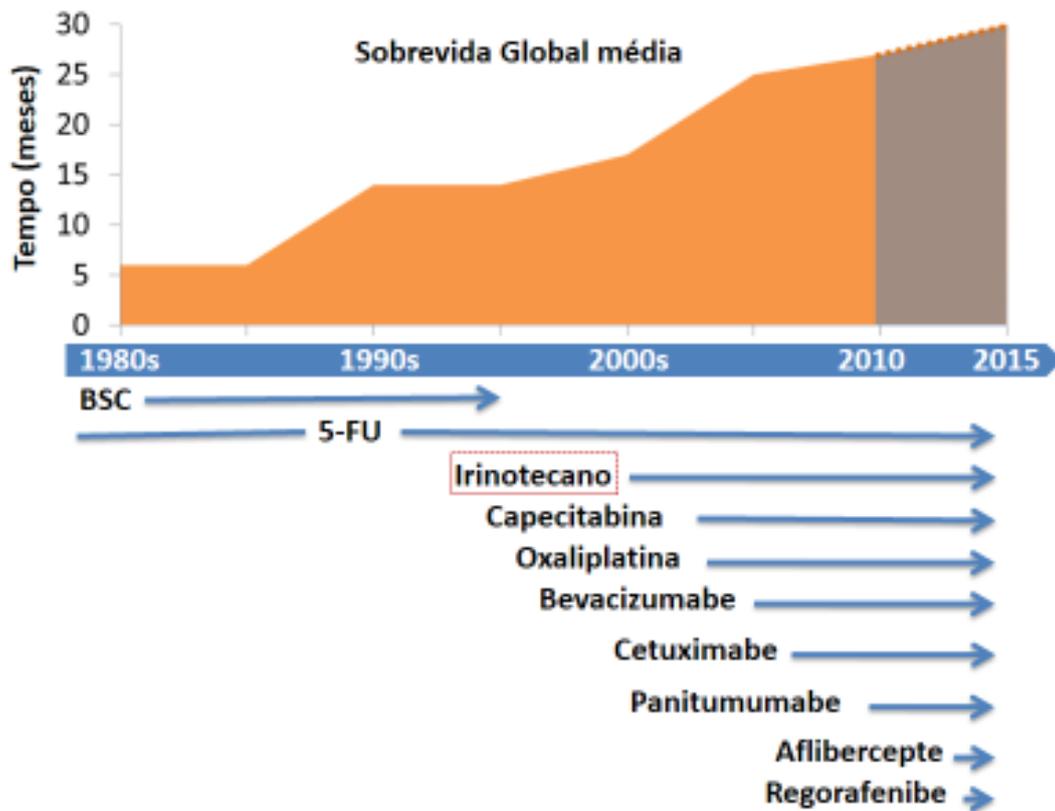
O termo câncer é utilizado para definir um conjunto de doenças nos quais células anormais se dividem de forma descontrolada e que tem potencial de invadir e se alastrar em tecidos próximos através da corrente sanguínea e do sistema linfático (National Cancer Institute, 2016). Atualmente o câncer é a segunda causa de óbito no mundo, apenas atrás das doenças cardiovasculares (OMS, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima 27 milhões de novos casos de câncer no mundo em 2030, com uma expectativa de 17 milhões de mortes e 75 milhões de sobreviventes a esta doença, devido principalmente às mudanças demográficas e à adoção crescente de certos aspectos do estilo de vida ocidental, como o sedentarismo e a alimentação industrializada (DENLINGER & ENGSTROM, 2011; FRANCESCHI & WILD, 2013). Nas últimas décadas, o câncer tornou-se um problema de saúde pública mundial e seus efeitos vão incidir principalmente em países de baixa e média renda. 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 (OMS, 2015). No Brasil, as estimativas para o ano de 2016, preveem uma incidência aproximada de 596.070 casos de câncer, sendo 300.870 casos novos para o sexo feminino e 295.200 para o sexo masculino (INCA, 2016).

Estratificando-se o câncer por seus tipos, o câncer colorretal aparece como um dos mais prevalentes, sendo o segundo câncer mais frequente na Europa (SCARTOZZI *et al.*, 2016) e no Brasil (INCA, 2016), liderando o número de mortes relacionadas ao câncer mundialmente com aproximadamente mais de um milhão de novos casos por ano (FERLAY *et al.*, 2011).

Entretanto, nas últimas décadas, alguns fatores tem contribuído para a melhora na sobrevida dos pacientes com câncer colorretal (CCR) e câncer colorretal metastático (CCRM) como por exemplo, melhora no estadiamento e técnicas cirúrgicas além do desenvolvimento e incorporação de novos quimioterápicos e agentes biológicos ou até mesmo de novos protocolos clínicos (WONG & CUNNINGHAM, 2008; ANDRÉ *et al.*, 1999; DOUILLARD *et al.*, 2000; de GRAMONT *et al.*, 2000; GIACCHETTI *et al.*, 2000; VAN CUTSEM *et al.*, 2001; HURWITZ *et al.*, 2004; GIANTONIO, *et al.*, 2007; VAN CUTSEM *et al.*, 2007; SOBRERO *et al.*, 2008; CASSIDY *et al.*, 2008; DOUILLARD *et al.*, 2010). Por exemplo, com o uso dos agentes biológicos como os inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (anti-EGFR), cetuximabe e panitumumabe, e inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF), bevacizumabe, houve um aumento na sobrevida dos pacientes que passou de 5-6

meses com a terapia de suporte para 30 meses e uma taxa de sobrevida que agora é de 60% (SCARTOZZI *et al*, 2016) (FIGURA 1).

**FIGURA 1. A incorporação de novas drogas nas últimas 3 décadas tem contribuído para um aumento na sobrevida dos pacientes com CCRm**



Aumento significativo da sobrevida de pacientes em tratamento para câncer colorretal metastático ao longo dos últimos 30 anos com a incorporação de novas drogas como o irinotecano, capecitabina, oxaliplatina e terapias-alvo como cetuximabe, panitumumabe, aflibercepte e regorafenibe.

Embora o grande avanço na terapêutica alcançado nos últimos anos possibilitou um prognóstico melhor em diversos tipos de tumores, os pacientes oncológicos continuam sofrendo bastante com a toxicidade oriunda da quimioterapia e radioterapia. O número limitado do arsenal terapêutico para tratar os efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia se dá muito em parte ao escasso conhecimento dos mecanismos patológicos subjacentes à toxicidade do tratamento oncológico (BOSSI, 2015). Dessa forma, os efeitos colaterais conduzem, na maioria das vezes, ao interrompimento do tratamento quimioterápico e radioterápico, levando ao comprometimento da eficácia geral do tratamento oncológico (BOSSI, 2015).

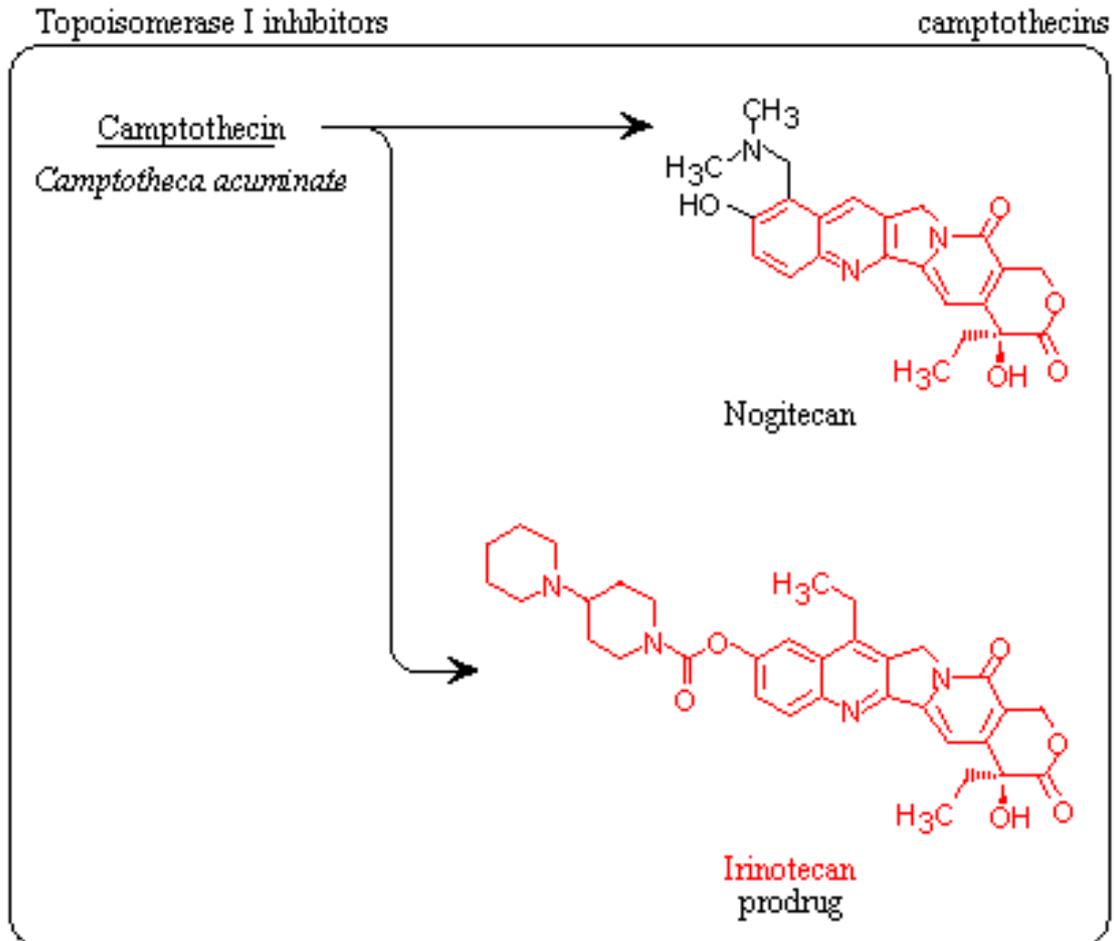
Durante aproximadamente 50 anos, o tratamento para o câncer colorretal metastático era baseado apenas em 5-fluoruracil, pois apresentava uma boa atividade contra este tipo de neoplasia. Entretanto, a partir do final da década de 90 os oncologistas começaram a incorporar uma nova droga que demonstrava ter uma boa atividade contra linhagens de câncer de ovário e CCRm. Este quimioterápico adicionado à terapêutica oncológica para tratar o câncer colorretal metastático (CCRm) é o irinotecano.

### 1.1 Irinotecano

Originário da China e do Tibet de uma planta chamada *Camptotheca acuminata*, o irinotecano (**FIGURA 2**) é um derivado semi-sintético da camptotecina e foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por Wall *et al.*, em 1966. O irinotecano e seu metabólito ativo (SN-38) são inibidores seletivos da topoisomerase I, uma enzima envolvida na replicação e transcrição do ácido desoxirribonucléico (DNA) responsável por diminuir a supertorção gerada na replicação do DNA (KAWATO *et al.*, 1991). O irinotecano foi aprovado nos Estados Unidos inicialmente como tratamento de segunda linha para os pacientes com CCRm e pacientes com recidiva de câncer de ovário, mas atualmente tem sido utilizado como agente único ou combinado com outros quimioterápicos como 5-fluoruracil, oxaliplatina e bevacizumabe em protocolos para tratamento de primeira e segunda linha de neoplasias malignas gastrointestinais (LEE *et al.*, 2016), mas também utilizado no câncer de ovário (FUJII *et al.*, 2002), linfoma de Hodgking (RIBRAG *et al.*, 2003), câncer de pulmão de células pequenas e não-pequenas células (LANGER, 2004), pâncreas (ROCHA LIMA *et al.*, 2004), mama (PEREZ *et al.*, 2004) e de estômago (ENZINGER *et al.*, 2006).

Além desta ação antineoplásica, existem resultados evidenciando que os inibidores de topoisomerase I podem ser usados para tratar doenças caracterizadas por uma exacerbação da resposta imune como nos casos das infecções pelos vírus Influenza e Ebola além de produtos bacterianos, isto devido a inibição da topoisomerase I suprimir genes inflamatórios e proteger da morte decorrente de um intenso processo inflamatório (RIALDI *et al.*, 2016).

**FIGURA 2. Estrutura Química da camptotecina e derivados**



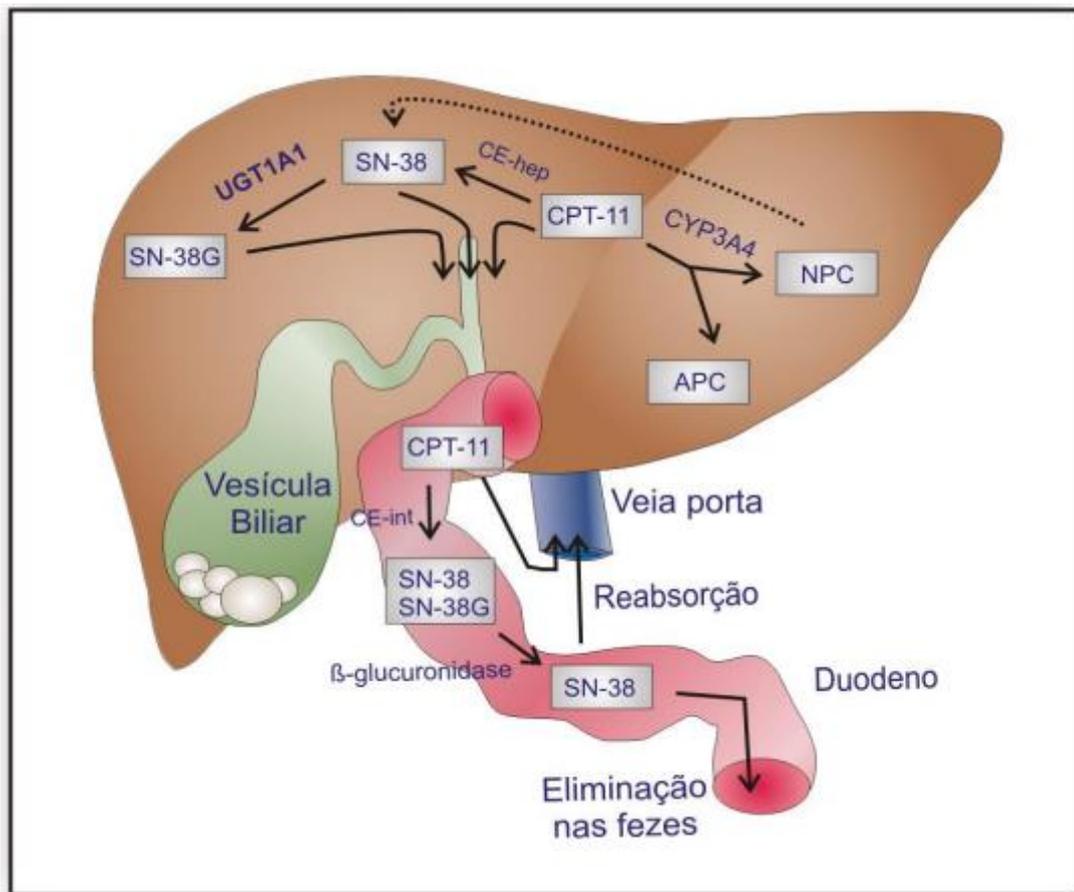
A camptotecina é um alcalóide extraído da *Camptotheca acuminata* (originalmente encontrada na China e no Tibet com o nome de *xi shu*, que significa árvore feliz). A partir dela é sintetizada outros inibidores de topoisomerase I, como por exemplo o irinotecano, nogitecano e topotecano (não apresentado). FONTE: Kegg pathway.com

O irinotecano encontra-se na forma inativa, sendo na verdade uma pró-droga que ao atingir a circulação hepática por meio da ação da enzima carboxilesterase hepática e intestinal é metabolizada ao SN-38 (metabólito ativo) (KAWATO *et al*, 1991). Estudos bioquímicos e análises de citotoxicidade realizados *in vitro* em células humanas e de roedores mostraram que o metabólito ativo do irinotecano (SN-38) tem uma ação, pelo menos, 1000 vezes mais potente sobre a topoisomerase I que o próprio irinotecano (BERG *et al*, 2015; TAKIMOTO, ARBUCK apud KOIZUMI *et al*, 2006; CHESTER *et al*., 2003; RIVORY *et al*, 1997).

Após a conversão do irinotecano ao seu metabólito ativo por meio da carboxilesterase hepática e intestinal, a família da enzima uridina difosfato glicosiltransferase 1A (UGT1A) é

responsável por inativar e eliminar o SN-38 principalmente por via biliar (LEE *et al*, 2016). No entanto, enterobactérias produtoras de  $\beta$ -glicuronidases são capazes de desconjugar o SN-38G reativando o SN-38 e disponibilizando-o novamente para uma recirculação entero-hepática dando início ao processo novamente e amplificando o efeito (TAKASUNA *et al*, 1996) (FIGURA 3).

**FIGURA 3. Metabolismo do Irinotecano (CPT-11)**



Após o irinotecano (CPT-11) chegar ao fígado duas enzimas agem sobre ele, a primeira é a Carboxilesterase hepática (CE-hep) que irá gerar o metabólito ativo do irinotecano (SN-38). A segunda enzima é a CYP3A4 que gerará 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 também pode ser catabolizado pela CE-hep e gerar o SN-38. Por ação do polipeptídeo 1A da família enzimática uridina-difosfato-glicosiltransferase 1 há a formação dos glicuronídeos de SN-38 (SN-38G) que não possuem atividade biológica. O irinotecano (CPT-11) remanescente não-metabolizado no fígado, juntamente com o seu metabólito ativo (SN-38) e o glicuronídeo (SN-38G) são excretados na bile e chegam ao intestino delgado. Lá o CPT-11 pode ser catalizado pela Carboxilesterase intestinal (CE-int) gerando mais SN-38. Enterobactérias produtoras de  $\beta$ -glicuronidases presentes no intestino delgado podem desconjugar o SN-38G tornando o SN-38 novamente disponível no meio intestinal. O SN-38 pode ser eliminado nas fezes ou através da veia porta participar da recirculação entero-hepática. Adaptado de FREITAS, 2007.

A grande problemática do tratamento quimioterápico está na inespecificidade da ação do antineoplásico que não se limita exclusivamente às células tumorais, afetando também as

células normais e dessa forma conduzindo ao surgimento de efeitos colaterais que muitas vezes são determinantes para a redução do esquema terapêutico proposto e até mesmo a descontinuidade do tratamento, levando a um insucesso terapêutico e com sérios riscos de morte para o paciente. Neste ínterim, um dos mais proeminentes efeitos colaterais do irinotecano é denominado mucosite.

## 1.2 Mucosite Intestinal

O termo mucosite é utilizado na clínica para se referir ao dano causado pela terapia do câncer na mucosa de todo o trato digestório: cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, intestino e outras áreas do trato gastrointestinal. É provocada, principalmente, pela quimioterapia e radioterapia do câncer. É altamente significativa e muitas vezes uma toxicidade dose-limitante do tratamento oncológico (LALLA *et al.*, 2014). Ocorre em aproximadamente 20% a 40% dos pacientes que recebem quimioterapia convencional (JONES *et al.*, 2006), 80% dos pacientes que recebem um alta dose de quimioterápico como condicionamento para transplante de células-tronco hematopoiéticas (VERA-LLONCH *et al.*, 2007) e quase todos os pacientes que recebem radioterapia de cabeça e pescoço (VERA-LLONCH *et al.*, 2006). Pode ser caracterizada pelo surgimento de sinais iniciais como eritema, podendo evoluir para ulceração de toda a mucosa, resultando em dor, disfagia, diarreia e disfunção, dependendo do tecido afetado (SONIS; FEY, 2002; SONIS *et al.*, 2004; SCULLY; SONIS, 2006). A mucosite intestinal é o efeito colateral mais notório observado no tratamento quimioterápico a base de irinotecano e apresenta sintomas debilitantes como dor, náusea, vômitos e diarreia (KEEFE, 2007). Na sua forma mais grave a mucosite intestinal pode influenciar negativamente no prognóstico dos pacientes, uma vez que a diminuição da dose, bem como a interrupção do tratamento são eventos que ocorrem com certa frequência (ELTING *et al.*, 2003; TROTTI *et al.*, 2003). Além disso, a mucosite tem um impacto econômico considerável devido aos custos associados ao manejo terapêutico dos sintomas, suporte nutricional, controle das infecções secundárias e hospitalização que muitas vezes são requeridas (ELTING *et al.*, 2003).

De forma a conduzir melhor uma conduta terapêutica, possibilitando melhores desfechos clínicos, nos últimos anos surgiu uma prática que é cada vez mais crescente e que é conhecida como medicina baseada em evidências. Consiste em se valer das evidências

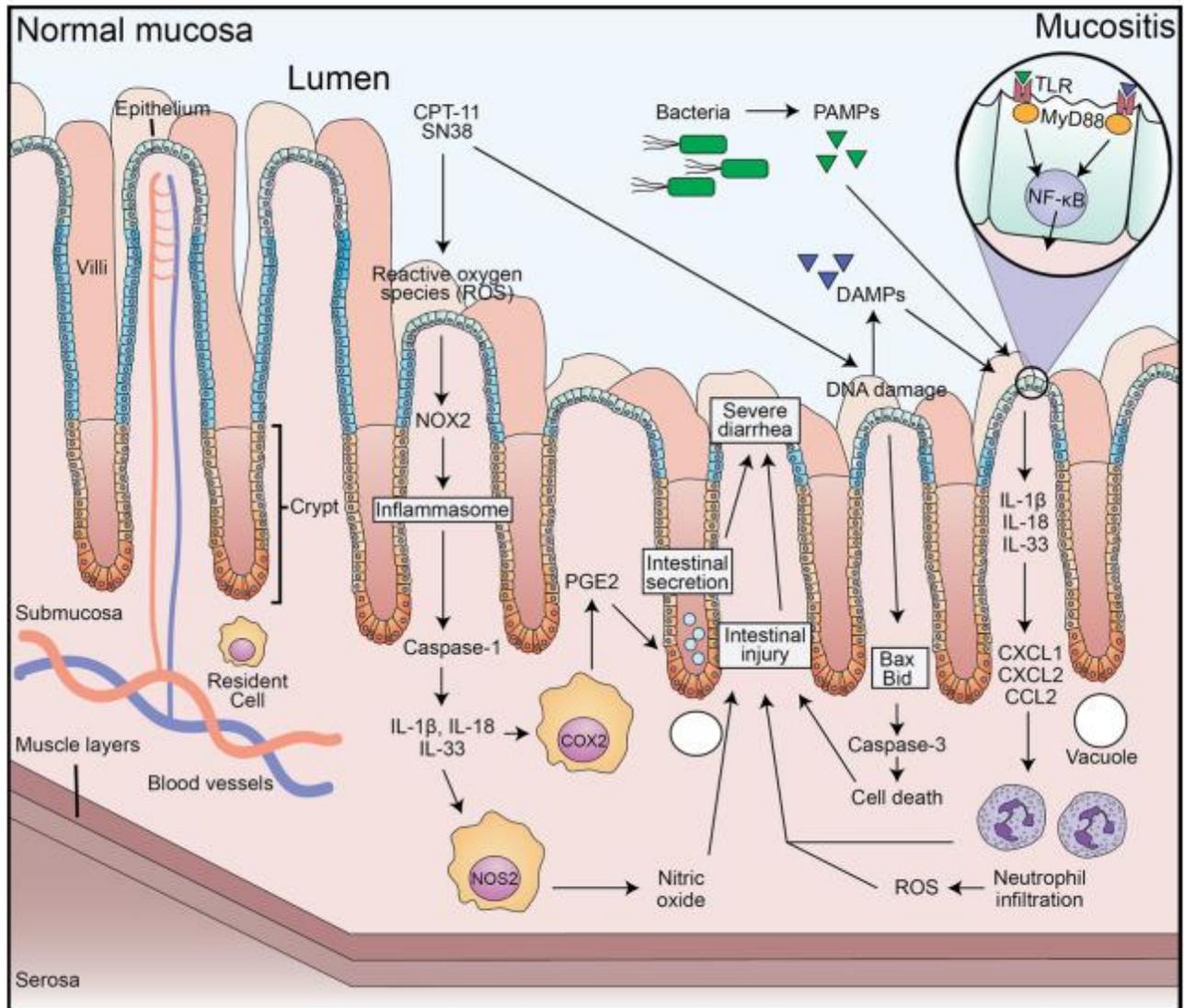
científicas demonstradas experimentalmente por todo o método científico como referência para utilização de novos medicamentos, novas técnicas de exame e manejo terapêutico. Isto possibilita uma padronização nas condutas médicas e minimiza os erros provenientes da terapêutica. Dessa maneira, os *guidelines*, um compilado das evidências científicas para um determinado assunto, servem para respaldar e orientar a escolha dos medicamentos utilizados. A Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer e Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ISOO) em 2014 atualizou uma orientação para o tratamento da mucosite intestinal que recomenda por exemplo, a utilização de amifostina intravenosa para prevenir retite em pacientes que estão recebendo radioterapia, ocreotida subcutâneo duas vezes por dia quando a loperamida for ineficaz para tratar diarreia induzida por doses padrão ou elevadas da quimioterapia associada ao transplante de medula óssea. Também recomenda-se o uso de enemas de sucralfato e sulfassalazina para protocolos específicos de tratamento como por exemplo para tratar a retite crônica induzida por radioterapia (retite actínica). Além desses, mais recentemente foram incorporadas três novas orientações que são: 1) o uso de oxigênio hiperbárico para tratar a retite por radioterapia (retite actínica); 2) o uso de agentes probióticos contendo espécies de *Lactobacillus spp.* para prevenção da diarreia induzida pela quimioterapia e radioterapia em pacientes com câncer pélvico e por último 3) a recomendação de não usar supositórios de misoprostol (análogo da prostaglandina E2) para prevenção da retite aguda induzida pela radioterapia (LALLA, *et al.*, 2014). Dessa forma, o estudo dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da mucosite intestinal é de fundamental importância para a melhor abordagem terapêutica deste efeito colateral e sucesso terapêutico.

Melo *et al.*, 2008 mostraram o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC (quimiocina análoga da interleucina 8 humana) na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano e que a modulação farmacológica com pentoxifilina e talidomida preveniu de maneira significativa a lesão intestinal. Adicionalmente, Lima-Júnior *et al.*, 2011 descreveram a participação do óxido nítrico (NO) nesta patogênese, revelando o papel das citocinas na ativação do óxido nítrico sintase (iNOS) e que o uso do infliximabe e pentoxifilina reduziram a expressão de iNOS, assim como a aminoguanidina preveniu o dano inflamatório, a hipercontratilidade e a diarreia. No trabalho de 2014, Lima-Júnior *et al.*, mostraram o envolvimento da caspase-1 e da IL-18 na patogênese da mucosite intestinal pelo irinotecano e que o bloqueio desta citocina pró-inflamatória com a proteína ligante de IL-18 (IL-18bp) foi capaz de atenuar este processo inflamatório. Seguindo a elucidação dos mecanismos subjacentes da mucosite intestinal por irinotecano, Guabiraba *et al.*, 2014 mostraram o papel da

IL-33 nesta patogênese e que a modulação com o receptor solúvel (ST2) desta interleucina foi capaz de atenuar a mucosite. Wong *et al.*, 2015 evidenciaram a participação do TLR-2, TLR-9 e da proteína adaptadora MyD88 na patogênese da mucosite intestinal, onde percebeu-se que em animais desprovidos geneticamente (*Knock-out*) para TLR-2 e MyD88 houve um efeito protetor no desenvolvimento do processo inflamatório instaurado pela administração do irinotecano além da prevenção da diarreia e uma melhora na condição clínica observada pelo aumento na sobrevivência. Sugeriu-se então que a modulação farmacológica específica deste receptor e desta proteína adaptadora poderia ser clinicamente relevante no impacto terapêutico.

A **FIGURA 4** apresenta resumidamente o envolvimento de diversos mediadores inflamatórios e elementos que já foram estudados pelo Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer e que possibilitaram uma melhor compreensão da patogênese desta toxicidade importante do irinotecano. O irinotecano (CPT-11) e o seu metabólito ativo SN-38 podem lesar o epitélio intestinal de forma direta induzindo a morte celular por apoptose através da geração de espécies reativas de oxigênio que ativam o inflamossoma e um processo dependente de caspase-1 para o desenvolvimento das pro-interleucinas IL-1, IL-18 e IL-33 nas suas formas maduras e ativas. Estas citocinas por sua vez induzem as células residentes (macrófagos) a expressarem COX-2 e iNOS, o qual leva a consequente produção de prostaglandinas e óxido nítrico resultando em dano intestinal. Adicionalmente, DAMPs (provenientes do dano celular direto ou pelo meio reacional) e PAMPs (provenientes das bactérias) estimulam TLRs para ativar MyD88 e NF- $\kappa$ B que por sua vez ativa a expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-18 e IL-33 e estas citocinas, por sua vez, contribuem para a produção de quimiocinas e recrutamento de neutrófilos amplificando, dessa forma, a geração de espécies reativas de oxigênio e consequentemente aumentando o dano intestinal (RIBEIRO *et al.*, 2016).

**FIGURA 4. Mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal por irinotecano**

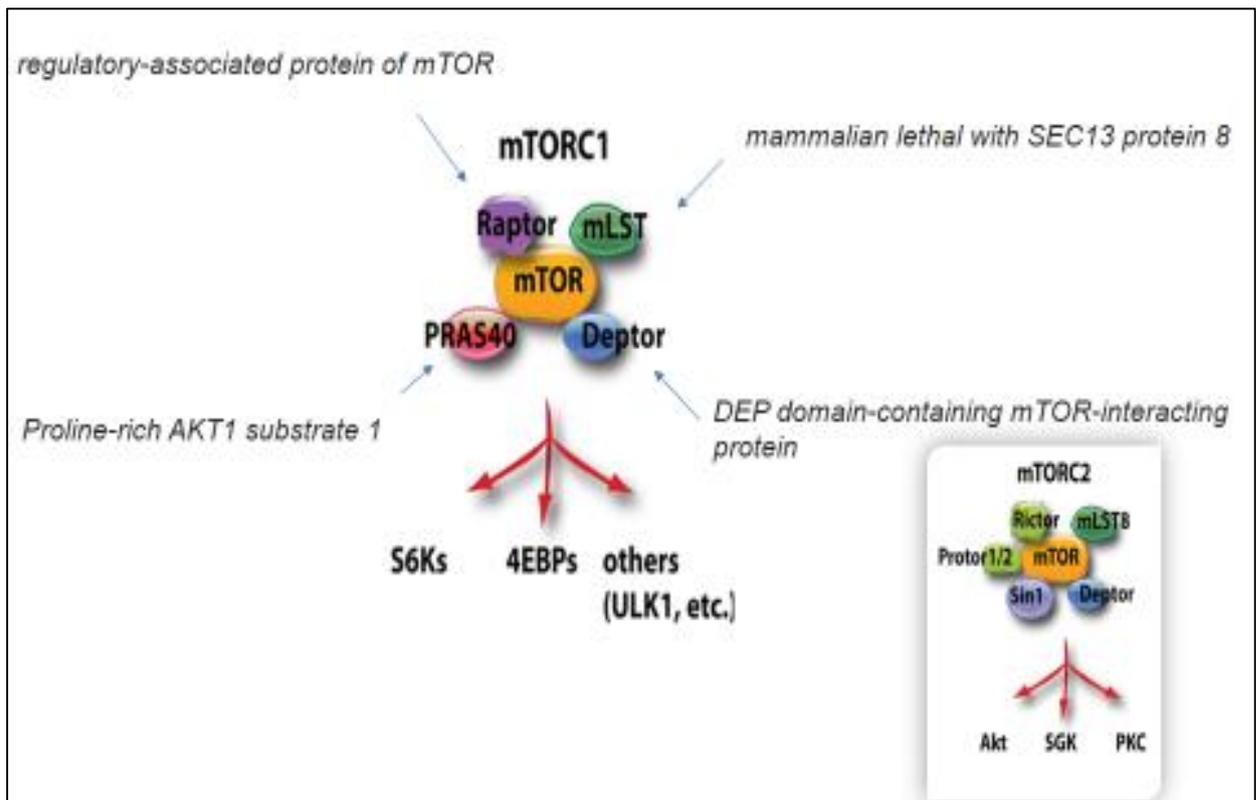


Desenvolvimento da mucosite intestinal pelo irinotecano. O irinotecano e o seu metabólito ativo SN-38 induzem a morte celular por apoptose através da geração de espécies reativas de oxigênio que ativam o inflamossoma e um processo dependente de caspase-1 para o desenvolvimento das pro-interleucinas IL-1, IL-18 e IL-33 nas suas formas maduras. Estas citocinas por sua vez induzem células residentes a expressarem COX-2 e iNOS, o qual leva a consequente produção de prostaglandinas e óxido nítrico resultando em dano intestinal. Adicionalmente, DAMPs (provenientes do dano celular direto ou pelo meio reacional) e PAMPs (provenientes das bactérias) estimulam TLRs para ativar MyD88 e NF-κB que por sua vez ativa a expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-18 e IL-33. Estas citocinas contribuem para a produção de quimiocinas e recrutamento de neutrófilos amplificando a geração de espécies reativas de oxigênio e consequentemente o dano intestinal. RIBEIRO, *et al.* 2016.

### 1.3 mTOR

A proteína-alvo da rapamicina em mamíferos, mTOR (*mammalian target of rapamycin*) é uma serina/treonina quinase intracelular pertencente à família das quinases relacionadas à fosfoinositídeo-quinases (PIKK) que por sua vez está intrinsecamente relacionada ao fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K) que tem um importante papel regulador do crescimento, metabolismo, proliferação e diferenciação celular. O mTOR interage com diversas proteínas adaptadoras para formar dois distintos e independentes complexos protéicos chamados mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTOR complexo 2 (mTORC2) (GUERTIN *et al.*, 2007). Estes dois complexos possuem diferentes processos regulatórios e atividades celulares e a montagem destes complexos é regulada por proteínas de interação do mTOR. O complexo mTOR 1 (mTORC1) é composto por cinco proteínas e seis proteínas compõem o mTORC2, sendo o mTOR a unidade central catalítica em ambos, conforme mostra a **FIGURA 5**.

**FIGURA 5 – Unidades protéicas formadoras do mTORC1 e mTORC2**

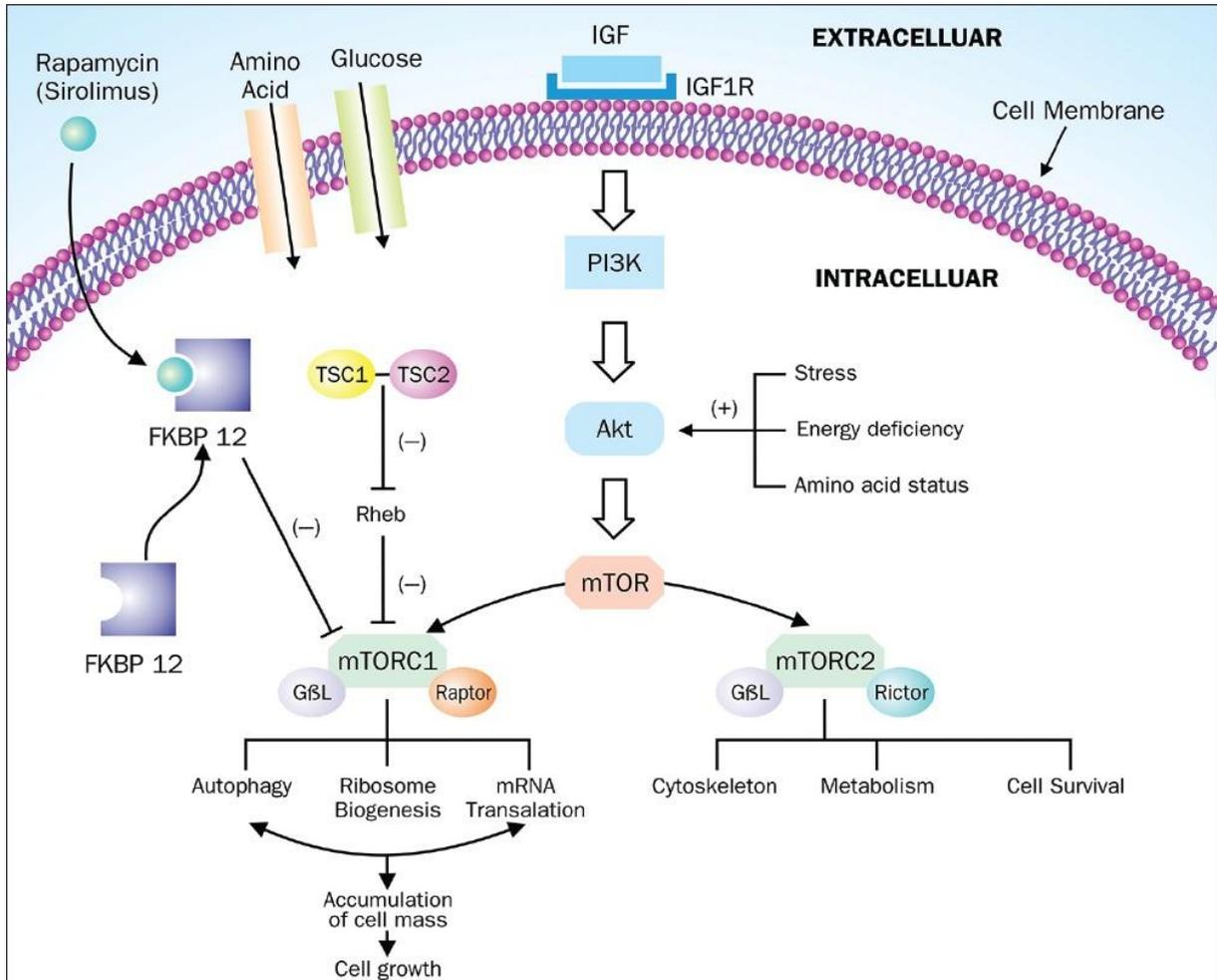


Proteínas componentes do mTORC1: mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 e Deptor. Proteínas componentes do mTORC2: mTOR, Rictor, MLST8, Protor 1/2, Sin1 e Deptor. FONTE: [www.http://jonlieffmd.com/blog/intelligent-protein-mtor](http://jonlieffmd.com/blog/intelligent-protein-mtor).

Além de ser o núcleo de vias de sinalização ativadas em resposta a nutrientes e fatores de crescimento, o mTOR é um sensor do equilíbrio energético e estresse oxidativo (BRACHO-VALDÉS *et al.*, 2011). Seu envolvimento no câncer se dá pelo fato de que o mTOR exerce um efeito crítico na sinalização celular que comumente está desregulada no câncer. O mTOR funciona integrando sinais extracelulares (hormônios e fatores de crescimento) com disponibilidade de aminoácidos e status de energia intracelular para controlar taxas de conversão e processos metabólicos adicionais (HAY e SONENBERG, 2004). A iniciação da tradução já está bem implicada na tumorigênese. Nesse caso, o mTOR aumenta a iniciação da tradução, em parte pela fosforilação de dois alvos principais, as proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BPs) e as quinases de proteína ribossomal S6 (S6K1 e S6K2) que cooperam para regular as taxas de iniciação da tradução (PETROULAKIS *et al.*, 2006). Lorne e colaboradores (2009) demonstraram a participação da via mTOR na ativação de neutrófilos e no desenvolvimento da lesão pulmonar aguda causada por injeção intratraqueal de LPS. O papel do LPS na ativação de outras células, como monócitos, macrófagos e células dendríticas também tem sido relacionado com o envolvimento da sinalização via mTOR (LORNE *et al.*, 2009; OHTANI *et al.*, 2008; SCHMITZ *et al.*, 2008; WEICHHART *et al.*, 2008), provavelmente envolvendo PI3K e Akt (THOMSON *et al.*, 2009; DELGOFFE *et al.*, 2009; WEICHHART *et al.*, 2008).

A PI3K (fosfoinositídeo-3-quinase) apresenta um papel chave na regulação de funções efetoras, incluindo o crescimento celular, proliferação, sobrevivência e transporte celular (DEANE *et al.*, 2004; KATSO *et al.*, 2001). A PI3K catalisa a fosforilação de fosfoinositóis de membrana e ativação da Akt (proteína quinase B) via fosforilação da Thr<sup>308</sup> (DEANE *et al.*, 2004). Com a inibição da Akt, macrófagos e células dendríticas ativadas por receptores Toll-like (TLR) apresentam um fenótipo de células deficientes em PI3K estimuladas por TLR, sugerindo uma ativação sequencial (PATHAK *et al.*, 2007). Um dos maiores alvos celulares da Akt é a proteína mTOR como descrito na **FIGURA 6**.

**FIGURA 6 – Via de sinalização do mTOR**



Diversos ligantes podem ativar o mTOR, mas a ativação sequencial através da PI3K e Akt representam um papel-chave na regulação da homeostase celular. Fatores como stress oxidativo, deficiência de energia e disponibilidade aminoácidos potencializam a atividade da Akt que por sua vez ativa mTOR. O principal inibidor de mTOR é a rapamicina que bloqueia o complexo mTOR 1 (mTORC1) através da interação com a proteína citosólica FKBP12 formando um complexo (rapamicina-FKBP12). Este complexo uma vez formado se liga ao mTORC1 e inibe a perpetuação da sinalização. FONTE: MADKE, 2013.

## 1.4 Inibidores de mTOR

### 1.4.1. Rapamicina

A rapamicina (**FIGURA 7**) é o principal inibidor do mTOR e é o que dá nome a esta proteína (alvo da rapamicina em mamíferos – mTOR). Foi descoberta há mais de 30 anos a partir de amostras do solo da ilha de Rapa Nui (ilha de Páscoa) e isolada em 1972 em Montreal no Laboratório de Pesquisa Ayerst pelo Dr. Suren Sehgal que batizou a molécula em homenagem a ilha onde foi descoberta. Por natureza é um antibiótico trieno macrocíclico

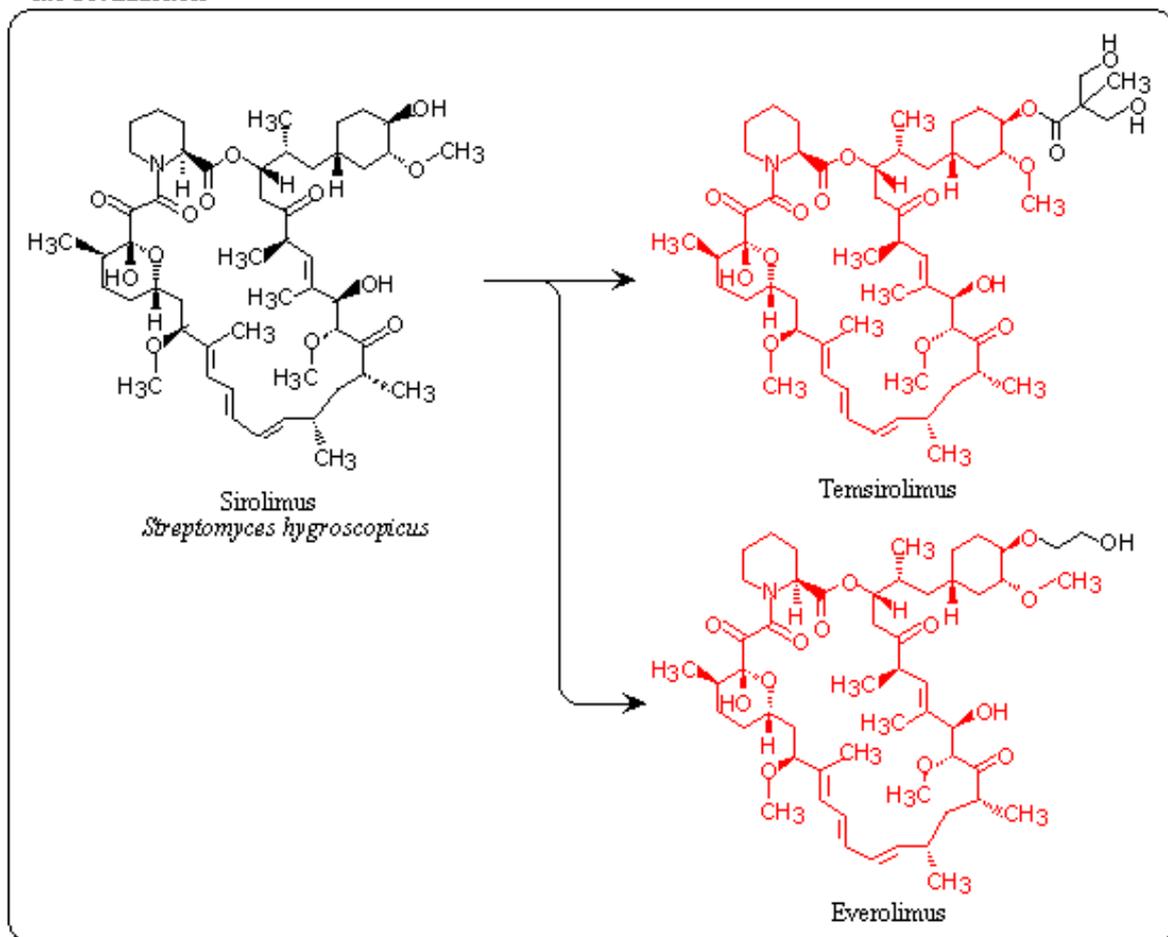
sintetizado por *Streptomyces hygroscopicus* e foi originalmente isolado como agente antifúngico tendo ação intensa contra cepas de *Candida albicans*, mas as pesquisas do Dr. Suren Sehgal comprovaram possuir atividade imunossupressora e anticâncer (SETO, 2012). Os últimos achados da ação imunossupressora com a rapamicina permitiram que ela fosse utilizada em pacientes transplantados e em 1998 fosse aprovada na agência reguladora americana (FDA) como agente profilático para a rejeição do transplante renal. A companhia Farmacêutica Wyeth™ comercializou a rapamicina (Rapamune® ou Sirolimo) no final da década de 90 e atualmente a rapamicina também é comercializada pela Pfizer™ em duas formulações: solução oral (60 mg/60mL) e comprimido, disponível nas doses de 1 mg e 2 mg (MADKE, 2013). Atualmente, a única indicação aprovada pelo FDA para o uso da rapamicina é como imunossupressor juntamente com corticosteróides e ciclosporina para prevenir a rejeição de órgãos após transplante cirúrgico (SETO, 2012). Entretanto há indicações *off-label* para o tratamento tópico de angiofibroma facial (WATAYA-KANEDA *et al.*, 2011; DeKLOTZ *et al.*, 2011), tratamento sistêmico para angiomiolipoma renal (CABRERA *et al.*, 2011), linfangioleiomiomatose (CASANOVA *et al.*, 2011; McCORMACK *et al.*, 2011), tumor cerebral associado a esclerose tuberosa (MAJOR, 2011; KOENIG *et al.*, 2008) e para a quimioterapia de várias malignidades (renal, câncer hepatocelular e linfoma das células do manto) (VOSS *et al.*, 2011; RIAZ *et al.*, 2012). A rapamicina também já foi utilizada no sarcoma de Kaposi (SAGGAR *et al.*, 2008), psoríase (ORMEROD *et al.*, 2005) e líquen plano (SORIA *et al.*, 2009) uma doença rara de natureza crônica que afeta a mucosa e pele. Além destes já citados, a rapamicina apresenta ação anticancerígena muito preponderante inibindo o crescimento de diversos tipos de tumores incluindo-se rhabdomiosarcoma, neuroblastoma, glioblastoma, carcinoma de pulmão de pequenas células, osteossarcoma, câncer de pâncreas, leucemia, linfoma de células B, câncer de mama e de cólon (PETROULAKIS *et al.*, 2006).

A rapamicina é um sólido cristalino branco à temperatura ambiente, praticamente insolúvel em água, mas prontamente solúvel em etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e outros solventes orgânicos (ABRAHAM e WIEDERRECHT, 1996). O mecanismo de ação da rapamicina se dá por meio de uma interação de alta afinidade com a proteína do receptor intracelular FKBP12 (proteína 12 kDa ligante do FK506). Intracelularmente a rapamicina se liga ao FKBP12 formando um complexo (rapamicina-FKBP12). O mTOR possui um domínio de ligação chamado “domínio de ligação do complexo rapamicina-FKBP12” (FRB). Após a ligação ao FRB do mTOR, o complexo rapamicina-FKBP12 inibe a atividade do complexo mTORC1 via autofosforilação e dissociação do complexo mTORC1, bloqueando assim o a

ligação do mTOR ao seus substratos (WULLSCHLEGER & LOEWITH, 2006). A sinalização do mTORC1 (principal complexo do mTOR) é efetuada pela modulação da fosforilação de efetores *downstream* que agem sobre a tradução ou transcrição como o S6K1 (quinase de proteína ribossômica dos reguladores de tradução S6) e a 4E-BP (proteína de ligação 4E do fator de alongamento cariótico) (ABRAHAM & WIEDERRECHT, 1996). Como consequência da inibição do complexo mTOR 1 há uma interferência no processamento natural da tradução dos mRNAs que codificam proteínas chave envolvidas na regulação do ciclo celular, glicólise e adaptação a baixas condições de oxigênio (hipóxia). Isso inibe o crescimento do tumor e a expressão de fatores indutores de hipóxia (por exemplo, fatores de transcrição de HIF-1). Basicamente há duas formas distintas de inibição do crescimento tumoral: a atividade antitumoral direta (capaz de matar células tumorais, reduzindo assim o índice de proliferação destas células cancerígenas) e a inibição do estroma tumoral (ABRAHAM & WIEDERRECHT, 1996).

mTOR inhibitors

**FIGURA 7. Estrutura química da Rapamicina e Everolimo**



A rapamicina (sirolimus) é um antibiótico macrolídeo obtido a partir de *Streptomyces hygroscopicus*. A estrutura química dos análogos da rapamicina (rapalogs) everolimo e temsirolimo também estão representados. FONTE: Keggpathway.com

### 1.4.2. Everolimo

Os congêneres da rapamicina, que foram desenvolvidos para apresentarem melhores propriedades farmacocinéticas, são conhecidos como rapalogs (análogos da rapamicina), a saber: everolimo (RAD001), temsirolimo (CCI-779) e ridaforolimo (AP23573) (MADKE, 2013). Dentre estes, o everolimo (**FIGURA 7**) configura como o principal destaque devido sua abrangência terapêutica e por esse motivo foi escolhido para este trabalho. O everolimo é um inibidor do mTOR e apresenta o mesmo mecanismo de ação da rapamicina (inibidor do mTORC1). No entanto, a presença do grupo hidroxietil no C-40 da estrutura molecular do everolimo confere a esta droga uma maior biodisponibilidade e distribuição tecidual e subcelular, devido diferentes afinidades com transportadores ativos conferindo assim uma maior potência em termos de interação com o mTORC2 do que o sirolimus (Rapamune®) (KLAWITTER *et al.*, 2015). Mas sua ação ainda se dá majoritariamente pela inibição do mTORC1. Este por sua vez é um regulador essencial da síntese protéica *downstream* do eixo PI3K/Akt, que está desregulado na maioria dos cânceres humanos.

Por esse motivo o everolimo é utilizado para tratar mulheres na pós-menopausa com câncer de mama avançado, pacientes com tumores neuroendócrinos avançados localizados no estômago, intestino, pulmão e pâncreas, pacientes com câncer avançado nos rins (carcinoma avançado de células renais), além de astrocitoma subependimário de células gigantes (um tumor cerebral específico) (NOVARTIS, 2014). No entanto, pesquisas mais recentes tem atribuído uma nova indicação terapêutica para o everolimo que tem demonstrado ser bem promissor no tratamento da esclerose tuberosa. Nesta patologia, há uma desordem genética causada pela mutação dos genes TSC1 e TSC2, os quais são responsáveis por codificar proteínas que formam o complexo supressor de tumor hamartina-tuberina, além dos complexos mTORC1 e mTORC2 (TRELINSKA *et al.*, 2016). Nos indivíduos com esclerose tuberosa, o mTORC1 está constitutivamente ativado conduzindo a uma excessiva sinalização via mTOR e sendo responsável por desenvolver anormalidades em muitos processos celulares incluindo crescimento celular, proliferação, síntese protéica e controle metabólico (HUANG e MANNING, 2008). Os sintomas da esclerose tuberosa refletem todas as funções do mTORC1 e mTORC2 e se manifestam no cérebro, pele, coração, pulmões, rins, ossos e vasos sanguíneos (KOHRMAN, 2012).

Em relação à farmacocinética, o everolimo apresenta um pico de concentração após 1 a 2 horas quando administrado em pacientes com tumores sólidos numa dose oral de 5 a 70 mg. A taxa de ligação plasmática é de quase 75% em indivíduos saudáveis e em pacientes com insuficiência hepática moderada. É substrato para o citocromo CYP3A4 e gera seis principais metabólitos, que apresentam uma atividade 100 vezes menor que o everolimo. Sua excreção se dá principalmente nas fezes (80%) e urina (5%) (NOVARTIS, 2014).

Nos últimos anos tem aumentado o reconhecimento da relação existente entre o uso de inibidores de mTOR e dano na mucosa oral, denominado mIAS (do inglês, *mTOR inhibitors associated-stomatitis* - estomatite relacionada aos inibidores de mTOR). Esta toxicidade é muito notória em pacientes em tratamento com everolimo para o câncer de mama invasivo (PETERSON *et al.*, 2016). Múltiplos ensaios clínicos com inibidores de mTOR reportam esta toxicidade no grau máximo (3-4) em até 9% dos pacientes e tem se tornado um efeito adverso comum da quimioterapia do câncer (SANKHALA *et al.*, 2009; YARDLEY, 2014). Martins *et al.*, 2013 analisaram múltiplos estudos clínicos de estomatite relacionada aos inibidores mTOR (mIAS) em 2.822 pacientes com câncer que foram tratados com everolimo, temsirolimo ou ridaforolimo e reportaram uma incidência de 52,9% de mIAS em todos os graus, com prevalência variando entre os inibidores de mTOR. De acordo com a avaliação desses ensaios clínicos, a prevalência de todos os graus de estomatite causada pelo uso dos inibidores de mTOR pode variar consideravelmente de 2% até 78% (MARTINS *et al.*, 2013). O **QUADRO 1** mostra o resultado de forma mais objetiva.

#### **QUADRO 1. Prevalência de lesão na mucosa oral associada com o uso de inibidores de mTOR**

Inibidor de mTOR	Prevalência da lesão da mucosa oral	
	Todos os graus	Graus 3/4
Everolimo	44-78%	4-9%
Temsirolimo	41%	3%
Ridaforolimo	54,6%	8,2%
Sirolimo	2-10%	0-2%

Fonte: Peterson *et al.*, 2016

A mIAS ocorre precocemente no tratamento com inibidores de mTOR e está associada com uma significativa morbidade e prejudicando o andamento do tratamento. Dessa forma, uma maneira de minimizar a estomatite relacionado aos inibidores de mTOR (mIAS) é através da prevenção, incluindo uma boa higiene oral, evitando lesar o epitélio da cavidade oral (PETERSON *et al.*, 2016). Uma análise retrospectiva de pacientes com câncer em uso de inibidores de mTOR relatou uma melhora em 87% dos casos de mIAS com a administração tópica ou sistêmica de corticosteróide (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

E qual seria o efeito da associação de um inibidor de mTOR como o everolimo (causador de mucosite oral) com o irinotecano (causador de mucosite intestinal) para o tratamento do câncer?

Bradshaw-Pierce *et al.*, 2013 avaliaram o efeito da combinação do everolimo junto com o irinotecano através de abordagens farmacológicas quantitativas em modelo animal de xenotransplante de câncer colorretal e encontraram que o everolimo potencializou os efeitos antitumorais do irinotecano demonstrando efeito sinérgico anti-proliferativo em múltiplas linhagens celulares de câncer colorretal humano (BRADSHAW-PIERCE *et al.*, 2013). De maneira semelhante, Pencreach *et al.*, 2009, observaram um efeito sinérgico marcante da rapamicina juntamente com o irinotecano em linhagens de câncer colorretal humano através de abordagens *in vivo* e *in vitro*. Notou-se uma modulação cooperativa que se deu através do eixo mTOR/HIF-1 $\alpha$ . O fator alfa-1 induzido por hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) é um importante fator de transcrição com um papel chave no metabolismo da célula tumoral. O HIF-1 $\alpha$  por sua vez é inibido tanto pela rapamicina quanto pelo irinotecano. O resultado final foi que, em contraste com a monoterapia, os tumores xenotransplantados tratados com a combinação rapamicina mais irinotecano mostraram uma potente inibição do eixo mTOR/HIF-1 $\alpha$  que foi acompanhado por uma dramática redução no volume do tumor. A conclusão do trabalho é que identificou-se o HIF-1 $\alpha$  como um possível alvo farmacológico e forneceu dados importantes para futuros ensaios clínicos considerando a combinação de rapamicina e irinotecano em baixas doses para o tratamento do câncer colorretal metastático (PENCREACH *et al.*, 2009).

Ao mesmo tempo que esta combinação de inibidores de mTOR (everolimo e rapamicina) junto com irinotecano vislumbra possibilidades na alternativa para o tratamento do CCRm pelo efeito sinérgico antitumoral, preocupa pela ocorrência epidemiológica de seus efeitos colaterais mais proeminentes, a saber: mucosite oral e mucosite intestinal,

respectivamente. Desta forma, com o presente trabalho pretende-se obter uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano e a sua modulação farmacológica com o uso de inibidores de mTOR, vislumbrando futuros alvos terapêuticos para um manejo clínico mais apropriado do Câncer Colorretal Metastático (CCRm) com eficácia e eficiência acurada.

---

**JUSTIFICATIVA**

---

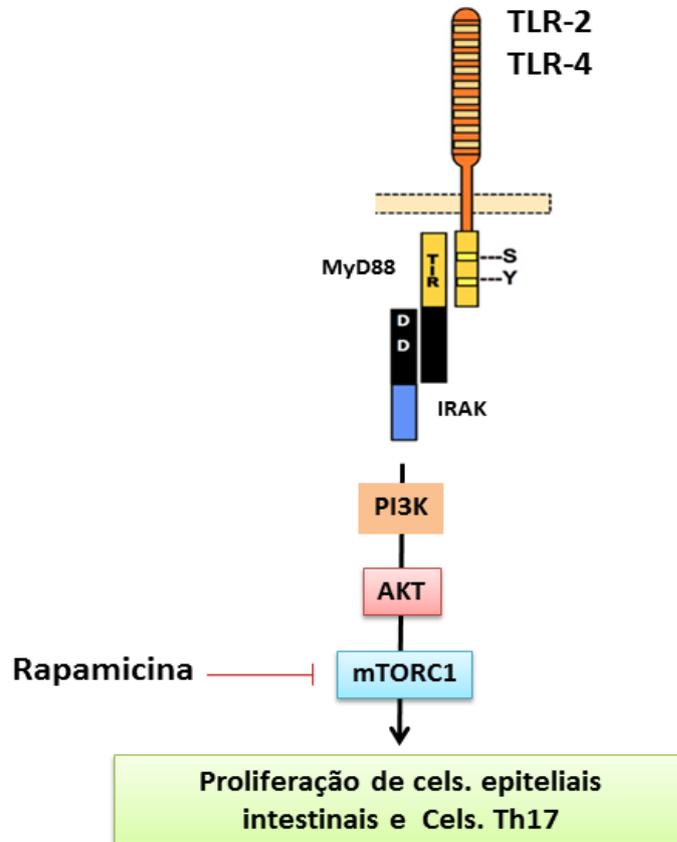
## 1.5 Justificativa

Muito já se avançou no que se refere ao conhecimento da fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por antineoplásicos (5-fluorouracil, metotrexato, irinotecano etc). Contudo, apesar dos relevantes avanços apresentados, existem lacunas que necessitam ser preenchidas para a completa elucidação dos fenômenos inflamatórios e patológicos inerentes ao tratamento quimioterápico. Ações preventivas e terapêuticas mais adequadas podem ser implementadas por meio do conhecimento da patogênese, sendo este o maior objetivo do presente trabalho: fornecer dados pré-clínicos cientificamente comprovados que possibilitem uma melhor caracterização e abordagem da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

O interesse especial nos aspectos iniciais da mucosite intestinal implica numa eventual possibilidade de modulação farmacológica do processo. Como ainda hoje não se dispõe de meios efetivos para amenizar os efeitos da mucosite na maioria dos casos (RUBENSTEIN *et al.*, 2004), os pacientes ainda sofrem com sintomas desconfortáveis, com o maior risco de sepse e com a possível redução da eficácia do tratamento oncológico devido a atrasos e reduções de doses (PICO *et al.*, 1998; GIBSON *et al.*, 2003; BLIJLEVENS, 2007; KEEFE, 2007). Recentemente, Wong *et al.*, 2015 verificou que na mucosite intestinal induzida por irinotecano há ativação de receptores *Toll-like* com participação fundamental da proteína adaptadora MyD88, responsável por acoplar receptores *Toll-like* e conduzir uma sinalização intracelular onde o mTOR é um dos alvos finais. Observou-se neste trabalho que a deficiência de receptores *Toll-like* do tipo 2, bem como da proteína adaptadora MyD88, preveniu o desenvolvimento do dano intestinal e da diarreia causada pela administração do irinotecano (WONG *et al.*, 2015). Adicionalmente, um dado não publicado do nosso grupo revelou um aumento na expressão gênica do RNAm de mTOR em amostras de intestino de animais com mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Diante desses dados surgiu a pergunta se o mTOR seria um dos efetores responsáveis por conduzir o dano proporcionado pelo irinotecano, visto que existe um elo bem claro demonstrado na literatura (GARLANDA *et al.*, 2013) entre receptor *Toll-like* (TLR), proteína adaptadora MyD88 e mTOR, como pode ser visualizado na **FIGURA 8**.

FIGURA 8. Sinalização celular via TLR/MyD88/mTOR



Os receptores *Toll-like* estão intrinsecamente ligados a via do mTOR via proteína adaptadora MyD88 que comunica a sinalização através da PI3K e Akt. O mTOR desempenha papel fundamental na proliferação de células epiteliais intestinais e células Th17. A rapamicina é o principal inibidor do mTOR. FONTE: Adaptado de GARLANDA *et al.*, 2013.

---

## **OBJETIVOS**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o papel do mTOR na patogênese da mucosite intestinal induzidas pelo antineoplásico irinotecano.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar a expressão gênica do RNAm de cada componente do eixo PI3K/Akt/mTOR no intestino de camundongos C57BL/6 após administração de irinotecano.
- ✓ Avaliar o efeito da inibição da proteína mTOR sobre a mucosite intestinal induzida por irinotecano por meio de parâmetros funcionais gerais como curva ponderal, diarreia, escores histopatológicos de dano tecidual, morfometria e contagem total de leucócitos.
- ✓ Avaliar o efeito da proteína mTOR sobre a mucosite intestinal induzida por irinotecano por meio de parâmetros inflamatórios como atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e nível tecidual de citocinas.

---

## **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, pesando entre 20 e 26 g. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  num ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão. Os animais foram fornecidos pelo biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais e aprovadas sob o número de protocolo (CEUA 100/14) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC para uso de animais experimentais. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais, bem como a dor, o sofrimento e o estresse a que eles foram submetidos.

#### 3.2 Drogas

Irinotecano (Evoterin<sup>®</sup>, ampolas 100mg/5mL, Evolabis), Rapamicina (Sigma-Aldrich<sup>™</sup>), Everolimus (Afinitor<sup>®</sup> 10 mg/kg, Novartis<sup>™</sup>).

#### 3.3 Protocolo Experimental

##### 3.3.1 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano e tratamento com os inibidores de mTOR

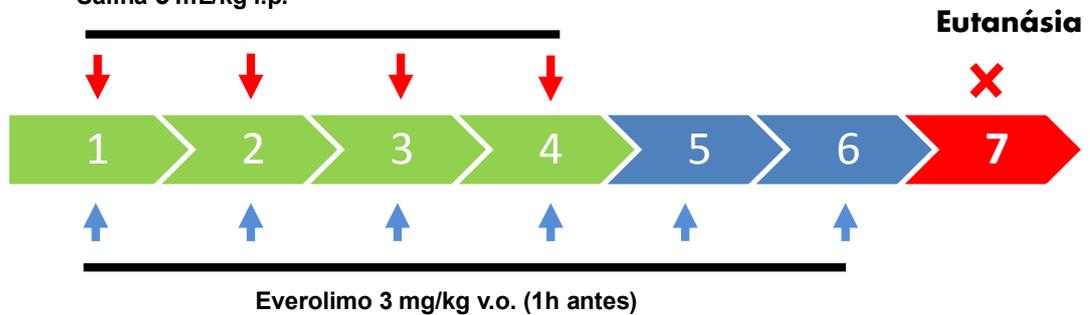
A mucosite foi induzida de acordo com protocolo desenvolvido por Melo *et al.*, (2008) e por Lima-Júnior *et al.*, (2014). Os camundongos (n=6/grupo) receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de solução salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.) ou irinotecano 75 mg/kg, i.p. (dose padrão) ou 45 mg/kg, i.p. (sub-dose) administrados uma vez ao dia durante quatro dias consecutivos, realizando as aplicações sempre no mesmo horário. A rapamicina foi utilizada apenas no protocolo de 5 dias e a dose foi de 1,5 mg/kg, i.p. dissolvido em DMSO, sempre administrada uma hora antes da aplicação do irinotecano. O everolimo foi utilizado no protocolo de 7 dias e a dose utilizada foi de 3 mg/kg, v.o, sempre administrado uma hora antes da aplicação de irinotecano, conforme a farmacocinética da droga.

A eutanásia dos animais foi realizada por deslocamento cervical após leve anestesia com tribromo (125 mg/kg) no quinto ou sétimo dia experimental após a primeira aplicação dos quimioterápicos (dia 1). A **FIGURA 9** descreve esquematicamente o protocolo experimental utilizado.

**FIGURA 9. Esquema do Protocolo experimental utilizado.**

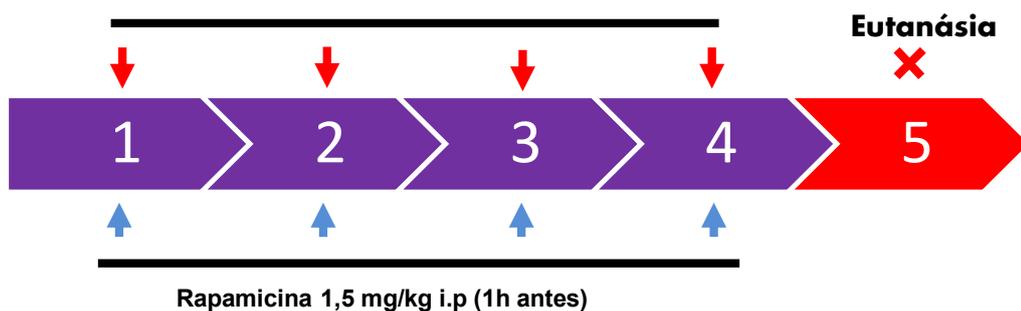
**a) PROTOCOLO 7 DIAS**

Irinotecano 75 (dose padrão da mucosite intestinal) ou 45 mg/kg i.p.  
Salina 5 mL/kg i.p.



**b) PROTOCOLO 5 DIAS**

Irinotecano 75 mg/kg i.p.  
Salina 5 mL/kg i.p.



Foram utilizados dois modelos experimentais: (a) 7 dias e (b) 5 dias. No modelo de 7 dias os animais receberam salina 0,9% (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p. ou 45 mg/kg, i.p) durante quatro dias consecutivos e foram tratados com everolimo 3 mg/kg, v.o durante seis dias 1h antes da administração de IRI (75 ou 45) e foram eutanasiados no sétimo dia experimental. No modelo de 5 dias os animais receberam salina 0,9% (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano 75 mg/kg, i.p. durante quatro dias consecutivos e foram tratados com rapamicina 1,5 mg/kg i.p também durante quatro dias 1h antes da administração de IRI 75 mg/kg e foram eutanasiados no quinto dia experimental. Fonte: Adaptado de MELO *et al.*, 2008 e LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014

### 3.4 Parâmetros a serem avaliados na Mucosite Intestinal

#### 3.4.1 Análise da variação de massa corpórea

Para avaliação ponderal, os animais foram pesados diariamente durante todo o período experimental (5 ou 7 dias). Os valores encontrados foram expressos em variação percentual de peso em relação ao peso inicial (dia 1=100%).

#### 3.4.2 Avaliação de parâmetro hematológico

Para verificação do efeito do irinotecano sobre os leucócitos circulantes, os animais foram levemente anestesiados com tribromoetanol (125 mg/kg, i.p.) para coleta de 20 $\mu$ L de sangue colhidos pelo plexo retro-orbital. A contagem total de leucócitos foi realizada utilizando contador hematológico automático modelo BC-5300Vet (MINDRAY™) ou a amostra foi diluída imediatamente em 380 $\mu$ L de solução de Turk onde foi realizada a contagem manual utilizando-se uma câmara de Neubauer.

#### 3.4.3 Avaliação do grau da diarreia apresentada

Ao longo dos dias de protocolo experimental os eventos de diarreia apresentados após o início do tratamento dos animais com irinotecano foram atribuídos escores como descrito por Kurita *et al.*, 2000, onde: 0=fezes com aspecto normal; 1=fezes levemente alteradas pouco umedecidas; 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal. (**FIGURA 10**). Após constatações experimentais observou-se que os animais que recebiam irinotecano apresentavam uma diarreia tão severa que mais da metade dos animais do grupo (n=6) morriam em decorrência desse efeito colateral. Por isso decidiu-se atribuir um novo escore para contemplar um aspecto importante do tratamento com esse antineoplásico: 4=morte.

**FIGURA 10. Escores para diarreia**



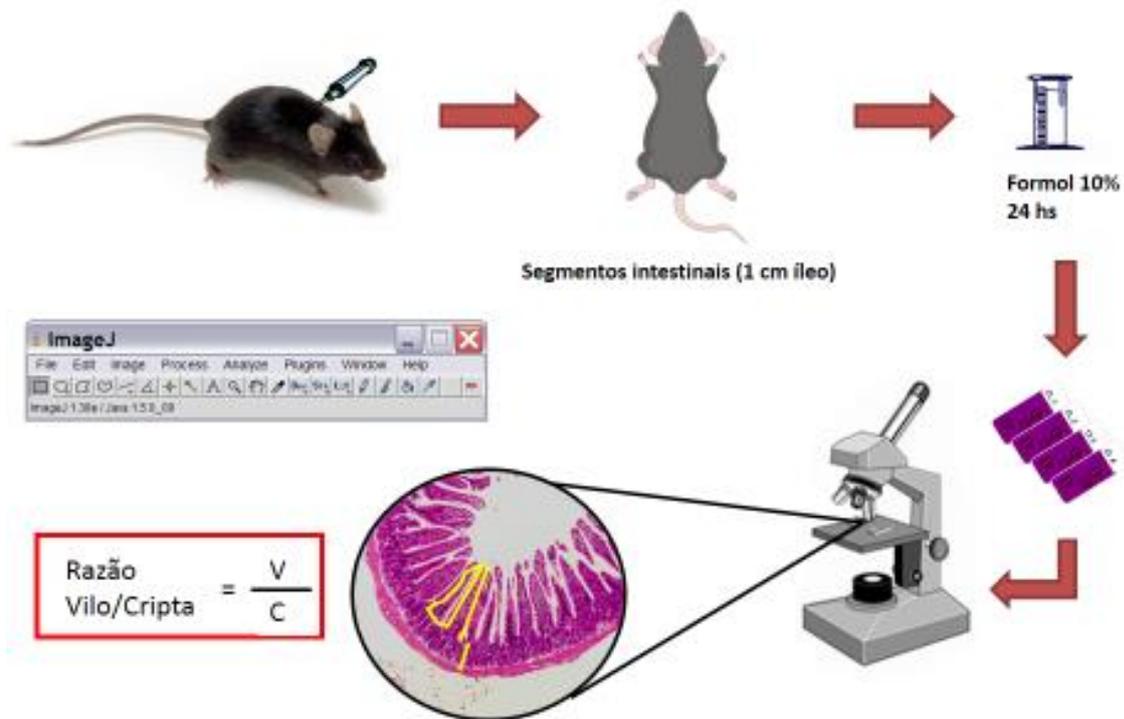
Escores atribuídos para os eventos de diarreia: 0=fezes com aspecto normal; 1=fezes levemente alteradas pouco umedecidas; 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal; 4=morte decorrente da diarreia. Escores propostos por KURITA *et al.*, 2000 e adaptado por CARVALHO, 2016. FONTE: WONG, 2013.

#### 3.4.4 *Análise histopatológica e morfométrica da mucosite intestinal*

Após a eutanásia dos animais, 1 cm do segmento terminal intestinal (íleo) dos camundongos foram removidos. A seguir, tais amostras foram lavadas e fixadas em formol tamponado 10% e processados para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica (100 e 400x). Essa análise tinha como objetivo obter a medida de vilos e criptas intestinais para correlação com a capacidade absorptiva (altura dos vilos). A razão entre o comprimento dos vilos intestinais e as criptas de Lieberkühn foi calculada em  $\mu\text{m}$  utilizando-se o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilos e criptas por corte histológico (**FIGURA 11**). Já para a análise histopatológica foi tomada em consideração a escala de Macpherson & Pfeiffer que varia de 0-3, onde: **grau 0** (normal); **grau 1** – mucosa (achatamento dos vilos, perda da arquitetura da cripta, infiltração de células inflamatórias esparsas, vacuolização e edema) - muscular (normal); **grau 2** – mucosa (achatamento dos vilos com células vacuolizadas e achatadas, necrose da cripta, intensa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema) – muscular (normal) e **grau 3** – mucosa (achatamento dos vilos com células vacuolizadas e achatadas, necrose da cripta, intensa infiltração de células

inflamatórias, vacuolização e edema) – muscular (edema, vacuolização e infiltração neutrofílica) (MACPHERSON & PFEIFFER, 1978).

**FIGURA 11. Esquema da análise morfométrica**

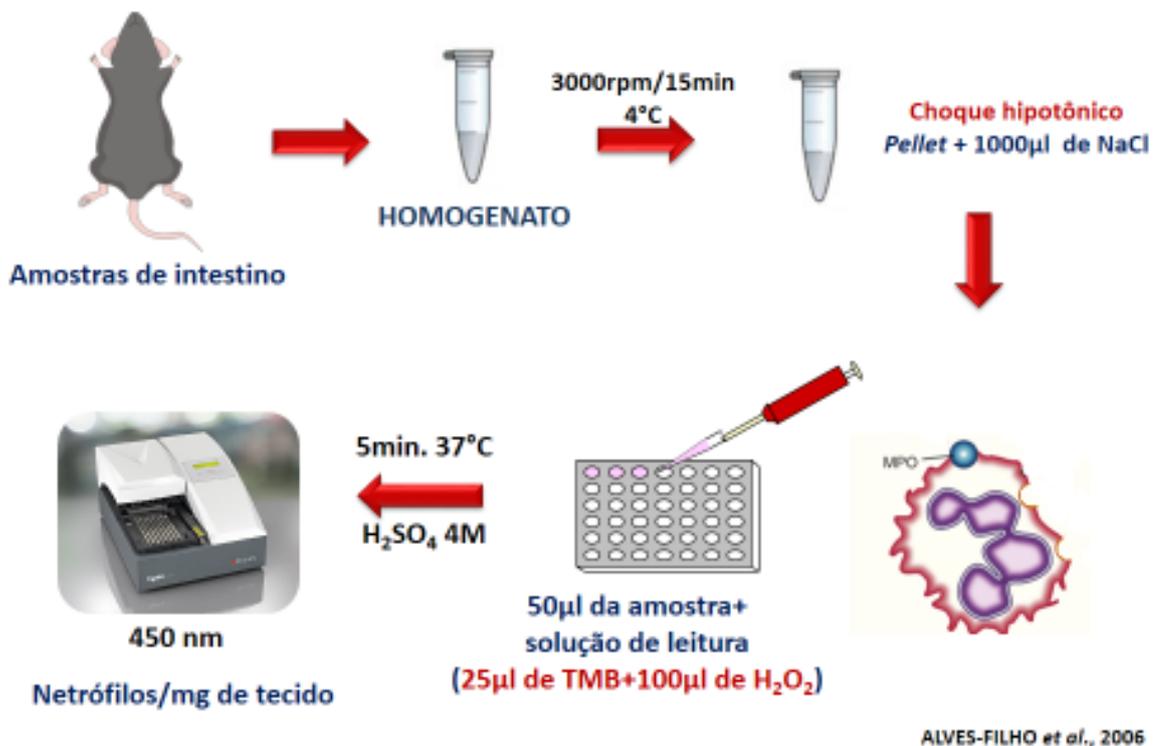


### 3.4.5 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, cuja presença é determinada pelo método colorimétrico ELISA. Foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por Alves-Filho *et al.*, 2006. Basicamente, após a eutanásia uma amostra de íleo de aproximadamente 1 cm pesando entre 40-60 mg foi homogeneizada em tampão de  $\text{NaPO}_4$  0,02M (pH 4,7) contendo 0,1 M de NaCl e 0,015M de EDTA dissódico e então centrifugado a 800g durante 15 minutos a 4°C. O *pellet* obtido foi submetido a choque hipotônico para lise (solução de NaCl 0,2%, seguido da adição de um volume igual da solução 30s depois). Após a lise foi realizado uma nova centrifugação, onde o *pellet* foi resuspenso em 300µL de tampão  $\text{NaPO}_4$  0,05M (pH 5,4) contendo Brometo de Hexadeciltrimetilamônio 0,5% (HTAB, Sigma). A atividade da enzima mieloperoxidase foi realizada com o reagente colorimétrico Tetrametilbenzidina 1,6mM (TMB) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,05mM. A reação foi interrompida

com a solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2M e a absorbância (450nm) foi determinada usando espectrofotômetro. As leituras foram comparadas com uma curva padrão de neutrófilos peritoneais de camundongos processados da mesma forma e os resultados obtidos foram expressos como atividade de MPO (neutrófilos/mg de tecido) (ALVES-FILHO *et al.*, 2006) (FIGURA 12).

**FIGURA 12. Esquema do ensaio de MPO**

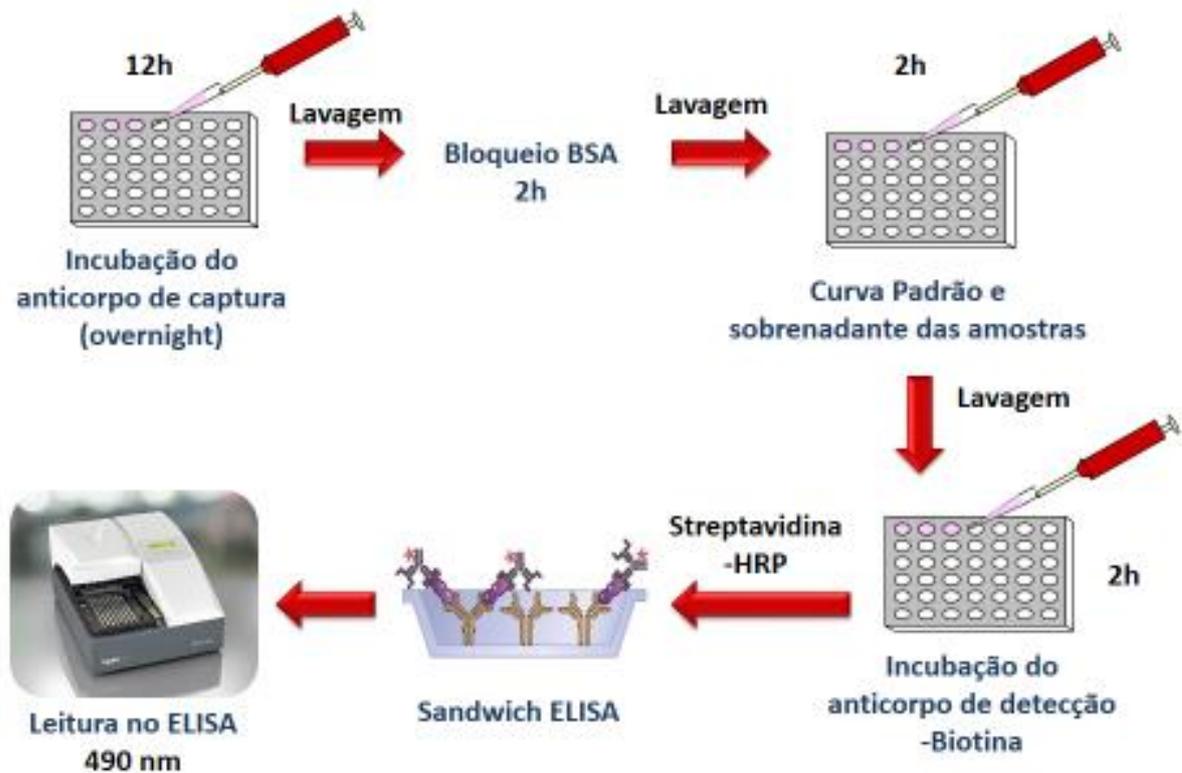


### 3.4.6 Dosagem de citocinas

As citocinas são moléculas fundamentais para determinar como se desenvolve um processo inflamatório. Após eutanásia, os animais tiveram uma amostra do íleo retirado para análise de citocinas e estocados em freezer -80 graus até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado em tampão  $\text{NaPO}_4$  0,02M (pH 4,7) e foi processado. A detecção de KC, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-KC, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  ou murinos (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após bloqueio das placas com BSA (1%) por 2 h, as amostras foram lavadas e a curva padrão e amostras foram

adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo de carneiro monoclonal biotilado anti-KC, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 2h, as placas foram lavadas e 50  $\mu$ L do complexo Streptavidina-HRP diluído 1:5000 foi adicionado. O reagente de cor 0-fenilenediamina (OPD, 50 $\mu$ L) foi adicionado 15min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 15 a 20min. A Reação enzimática foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4M e a absorbância medida a 490nm. O resultado foi expresso em pg/mg de tecido (**FIGURA 13**).

**FIGURA 13. Esquema do ensaio de ELISA**



#### 3.4.7 Reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) para a via PI3K/Akt/mTOR

A expressão gênica de proteínas da via PI3K/Akt/mTOR foi realizada usando um sistema de detecção CFX96 Touch™ PCR em tempo real (Bio-Rad, EUA). Os *Primers* foram projetados com base em sequências de RNAm obtidas a partir do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), como mostra a **TABELA 1**.

**TABELA 1.** Sequência de primers *Mus musculus* obtidos no Banco de dados da NCBI.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
<b>mTOR – F (5' – 3')</b>	CCTCTCTCACCACCACACCA
<b>mTOR – R (3' – 5')</b>	CGGATGTGGCTCTTCACAAA
<b>PI3K – F (5' – 3')</b>	CCATGACGAGAAGACGTGGA
<b>PI3K – R (3' – 5')</b>	GCAGCCCTGCTTACTGCTCT
<b>Akt – F (5' – 3')</b>	GCCTGCCCTTCTACAACCAG
<b>Akt – R (3' – 5')</b>	TGCATGATCTCCTTGGCATC
<b><math>\beta</math>-Actina– F (5' – 3')</b>	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
<b><math>\beta</math>-Actina – R (3' – 5')</b>	CAATAGTGATGACCTGGCCG

- Isolamento de RNA:

Inicialmente, as amostras de intestino (ileo) foram trituradas mediante homogeneização vigorosa em 300 mg de *glassbeads* de 0,1 mm (BioSpec, Bartlesville, OK, EUA) utilizando MiniBeadBeater (BioSpec). O RNA total foi isolado em cada uma das amostras utilizando o kit de extração *Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue* (Bio-Rad, CA, USA). A quantidade e a qualidade do RNA extraído foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, ThermoScientific) utilizando 260 nm e a razão 260/280nm, respectivamente. Em seguida, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir de 1 µg de RNA total por meio da reação da Transcriptase reversa utilizando o kit de síntese iScript™ (Bio-Rad) no termociclador C1000 Touch™.

- PCR em Tempo Real:

Ensaio de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 10 µL de supermixiQ™ SYBR® Green, 2 µL de cada *primer* (200 nM), 1µL de cDNA das amostras e 5 µL de água livre de RNAase. Controles negativos também foram testados, com o cDNA sendo substituídos por água livre de RNAase. Todas as amostras foram processadas em duplicata. As condições de PCR foram as seguintes: um período de desnaturação inicial a 95°C/7min, seguido por 45 ciclos de amplificação gênica. Cada ciclo consistiu de uma fase de desnaturação inicial a 95°C/20s, seguida por uma fase de anelamento a 60°C/20s e por fim uma fase de extensão a 72°C/45s. As amostras foram então submetidas a uma etapa de extensão a 72°C/3min. Para garantir a especificidade do produto de PCR, foi realizada a curva de *Melting*,

após cada reação, em que a temperatura da reação foi posteriormente aumentada 0,5°C a cada 15s, com início na temperatura de anelamento de um *primer* e terminando em 95°C. Foi utilizada como gene de referência a  $\beta$ -actina. Todas as amplificações foram analisadas pelo sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch™ (Bio-Rad). A expressão gênica relativa foi determinada usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak).

### **3.5 Análise estatística**

A análise estatística, realizada com o software GraphPad Prism®, versão 6.01, foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis para dados paramétricos e não-paramétricos, respectivamente, seguidos do teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou teste de Dunn ou ainda Teste T de Student ou Mann-Whitney quando necessário, baseando-se na continuidade das variáveis em análise. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

---

## **RESULTADOS**

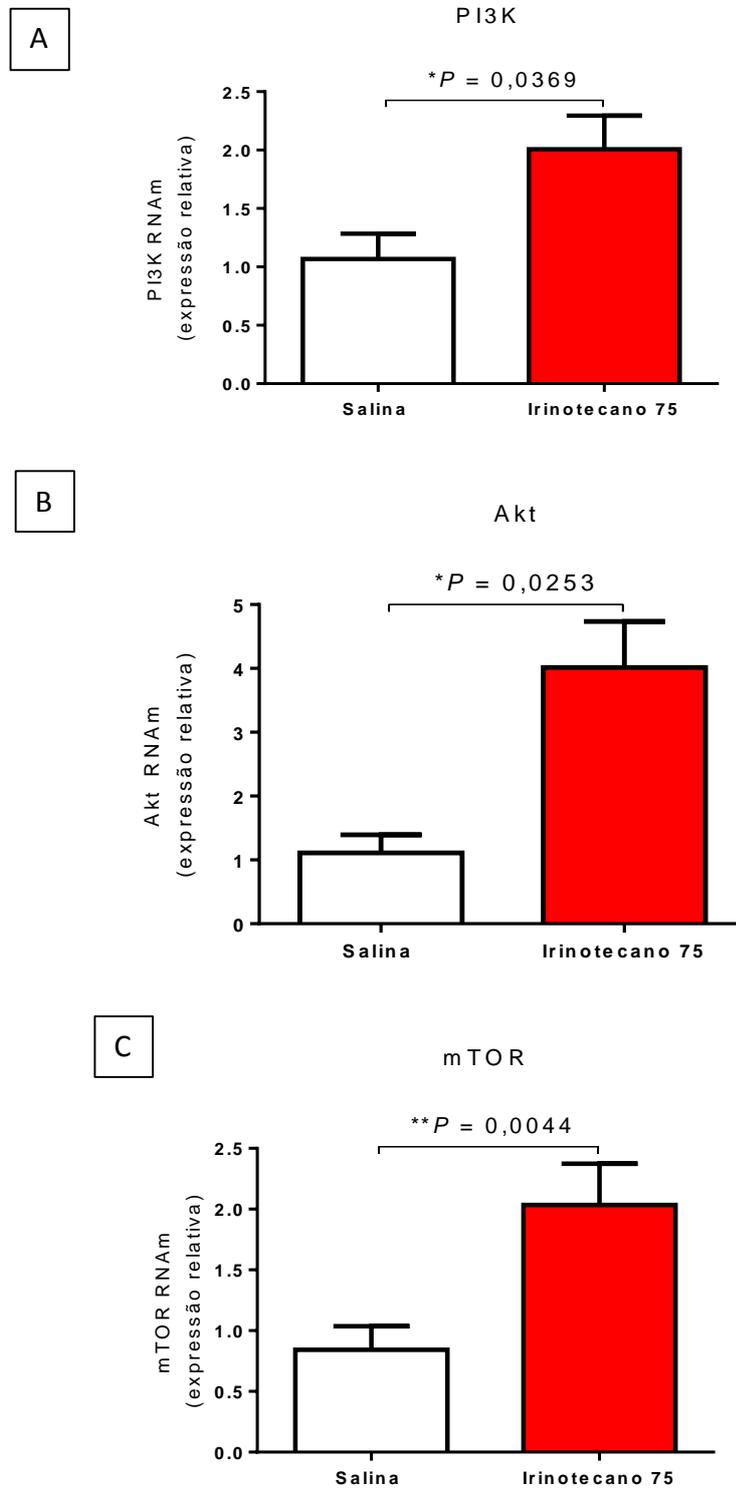
---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPRESSÃO GÊNICA DO RNAm DA VIA PI3K/Akt/mTOR NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO IRINOTECANO

A administração do irinotecano na dose de 75 mg/kg exacerbou a expressão do RNAm do eixo PI3K/Akt/mTOR (média=2,01±0,29; 4,02±0,72 e 2,03±0,34, respectivamente) de forma significativa ( $P<0,05$ ) quando comparado ao grupo controle que recebeu somente veículo (salina) (média=1,07±0,22; 1,11±0,28 e 0,84±0,19, respectivamente) (**FIGURA 14 A, B e C**).

**FIGURA 14. Irinotecano aumenta a expressão do RNAm do eixo PI3K/Akt/mTOR no íleo de camundongos C57BL/6**



Os animais (n=6/grupo) receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias. O resultado mostra que animais injetados com irinotecano na dose de 75 mg/kg apresentaram um aumento na expressão do mRNA de PI3K (A), Akt (B) e mTOR (C) quando comparado aos animais que receberam apenas salina. Para análise estatística foi utilizado o teste T de Student.

## 4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS GERAIS DA MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO

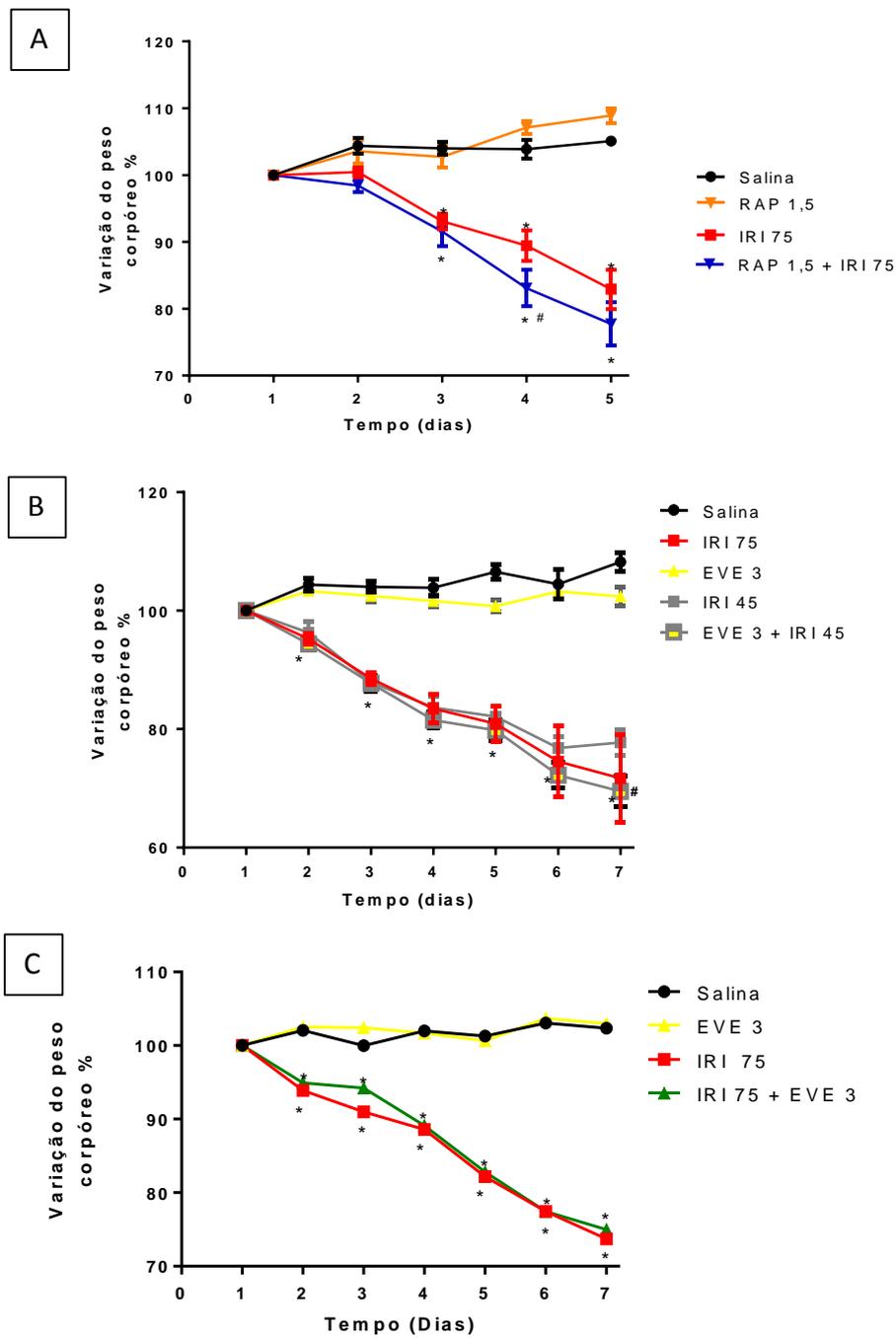
### 4.2.1. ANÁLISE DA VARIAÇÃO PONDERAL

A **FIGURA 15** mostra que o irinotecano tanto na sub-dose (45 mg/kg) quanto na dose padronizada para indução do modelo de mucosite intestinal (75 mg/kg) induzem uma significativa ( $P<0,05$ ) perda ponderal tanto em 5 dias quanto em 7 dias em relação ao primeiro dia do tratamento (dia 1=100%) [média(%)=83 (IRI 75 - **FIG. 15 A**); 71,7 (IRI 75 - **FIG. 15 B**); 77,8 (IRI 45 - **FIG. 15 B**) e 73,7 (IRI 75) - **FIG. 15 C**] quando comparado ao grupo controle que recebeu somente salina (média(%)=105,1; 108,2 e 103).

O pré-tratamento com rapamicina nos camundongos que receberam irinotecano 75 mg/kg intensificou significativamente a perda ponderal [média(%)=77,7] quando comparado ao grupo controle positivo irinotecano 75 mg/kg [média(%)=83]. Esta alteração começou a ficar evidente a partir do quarto dia (83,1%) (**FIG. 15 A**). De maneira semelhante, o pré-tratamento com everolimo nos camundongos que receberam a sub-dose de irinotecano (45 mg/kg) no protocolo de 7 dias também foi intensificada de maneira significativa [média(%)=69,5] quando comparado ao grupo que recebeu somente a sub-dose de irinotecano 45 mg/kg [média(%)=77,8] ou que foi injetado apenas com everolimo [média(%)=102,4] (**FIG. 15 B**). Não houve diferença no pré-tratamento com everolimo nos camundongos que receberam a dose padrão de irinotecano 75 mg/kg (**FIG. 15 C**).

Diante desses resultados começamos a perceber que a modulação farmacológica com os inibidores de mTOR (rapamicina e everolimo) mostrava uma tendência ao agravamento da lesão induzida pelo irinotecano. Então as análises sucederam de forma a tornar este agravamento mais evidente. O passo seguinte foi avaliar o aspecto dos escores para diarreia, parâmetro fundamental na avaliação da mucosite intestinal pelo irinotecano.

**FIGURA 15. Irinotecano e os inibidores de mTOR induzem perda ponderal em camundongos C57BL/6**

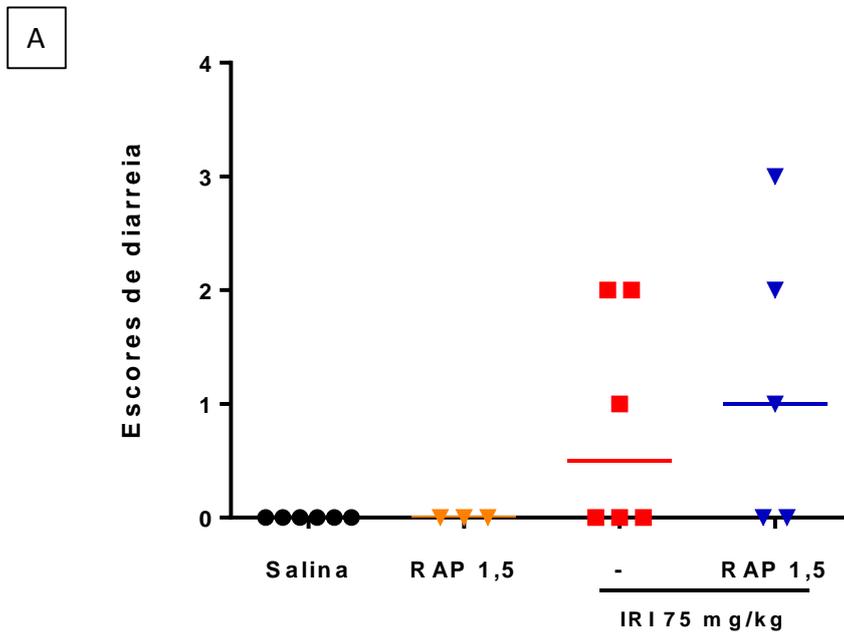


Os animais ( $n=6$ /grupo) receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p. ou 45 mg/kg i.p.) durante 4 dias consecutivos. Outro grupo de animais foram tratados com rapamicina (1,5 mg/kg, i.p.) por 4 dias ou everolimo (3 mg/kg, v.o) por 6 dias de maneira prévia ao irinotecano. Os animais foram pesados diariamente até o quinto ou sétimo dia experimental. O resultado mostra que animais injetados com irinotecano na dose de 75 mg/kg e 45 mg/kg apresentaram perda ponderal quando comparado aos animais que receberam apenas salina ou inibidor de mTOR (rapamicina (A) e everolimo (B e C) separadamente. Os animais pré-tratados com inibidor de mTOR e que receberam irinotecano em qualquer dose (45 mg/kg e 75 mg/kg) também apresentaram uma perda ponderal significativa. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M do percentual de variação da massa corpórea comparado ao peso inicial. \* $P<0,05$  vs grupo Salina ou RAP 1,5 ou EVE3. # $P<0,05$  vs IRI 75 ou IRI 45. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

#### 4.2.2. ANÁLISE DOS ESCORES PARA DIARREIA

No tocante a este aspecto, avaliando-se o quinto dia experimental, o irinotecano na dose de 75 mg/kg aumentou a mediana dos escores (0,5[0,2]) quando comparado ao grupo controle que recebeu somente salina (0[0,0]), no entanto essa diferença não foi significativa. Quando a rapamicina foi dada como pré-tratamento nos animais que receberam irinotecano 75 mg/kg, observou-se um aumento dos escores (1[0,3]), entretanto este aumento também não foi significativo. A rapamicina sozinha não alterou este parâmetro (0[0,0]) (**FIGURA 16 A e TABELA 2**).

**FIGURA 16.** Irinotecano aumenta os escores de diarreia em camundongos C57BL/6 e a inibição do mTOR com rapamicina tende a agravar este parâmetro (5 dias).



Os animais ( $n=6$ /grupo) receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) durante 4 dias consecutivos e avaliados quanto ao aspecto da diarreia no quinto dia experimental. A figura mostra que animais que receberam irinotecano 75 mg/kg apresentaram um aumento não significativo na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais que receberam apenas salina. Animais que receberam irinotecano mais pré-tratamento com rapamicina também houve aumento da mediana, mas não foi significativo. Os valores representam a mediana e variação dos escores de diarreia. Para análise estatística utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn.

**TABELA 2.** Avaliação da diarreia em animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano e tratados com rapamicina (5 dias)

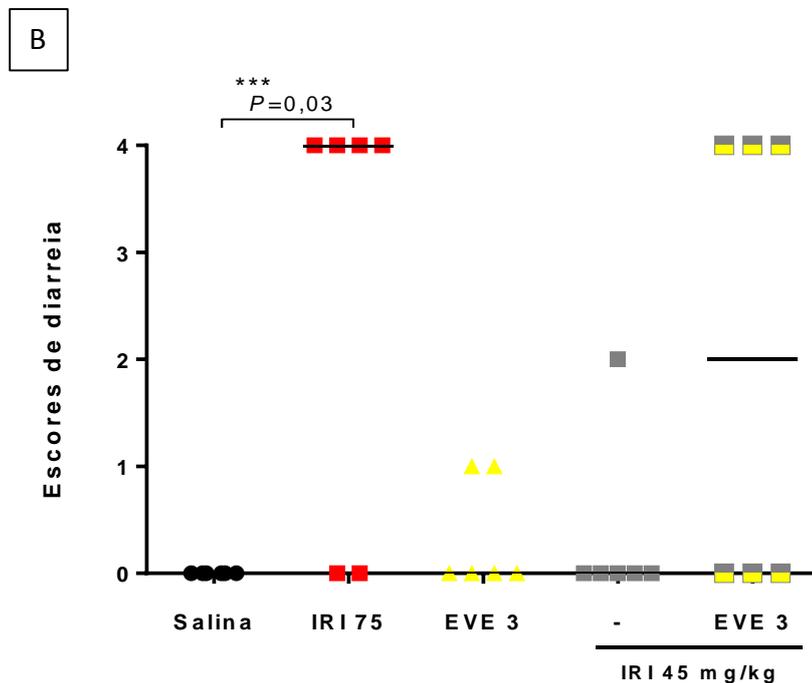
#### ESCORES PARA DIARREIA

GRUPOS	Mediana (min –máx)
SALINA	0 (0-0)
RAP 1,5	0 (0-0)
IRI 75	0,5 (0-2)
IRI 75 + RAP 1,5	1 (0-3)

Os dados representam mediana, mínima e máxima.

Quando avaliado o sétimo dia experimental (**FIGURA 16 B e C e TABELAS 3 e 4**), o irinotecano na dose de 75 mg/kg exacerbou significativamente os escores para diarreia (4[0,4]) quando comparado ao grupo controle que recebeu somente salina (0[0,0]) (**FIG. 16 B e C**). A sub-dose de irinotecano 45 mg/kg não alterou este parâmetro (0[0,2]). Quando administrado um inibidor de mTOR (everolimo 3 mg/kg) antes do irinotecano 45 mg/kg, observou-se que esse parâmetro foi alterado (2[0,4]), contudo este aumento não foi significativo.

**FIGURA 16.** Irinotecano aumenta os escores de diarreia em camundongos C57BL/6 e a inibição do mTOR com everolimo tende a agravar este parâmetro (7 dias).



Os animais (n=6) receberam salina (10 mL/kg, i.p.), irinotecano (75 mg/kg, i.p. ou 45 mg/kg, i.p.) durante 4 dias consecutivos e foram tratados com everolimo (3 mg/kg v.o.) durante 6 dias e avaliados quanto ao aspecto da diarreia no sétimo dia experimental. A figura mostra que animais que receberam irinotecano 75 mg/kg apresentaram um aumento significativo na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais que receberam apenas salina. A sub-dose de irinotecano 45 mg/kg não alterou a mediana. O pré-tratamento com everolimo 3 mg/kg nos camundongos que receberam uma sub-dose de irinotecano (45 mg/kg) aumentou a mediana dos escores, porém esse aumento não foi significativo. Os valores representam a mediana e variação dos escores de diarreia. \*\*\* $P=0,03$  vs Salina (teste Mann-Whitney).

**TABELA 3.** Avaliação da diarreia em animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano e tratados com everolimo na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg (7dias)

#### ESCORES PARA DIARREIA

GRUPOS	Mediana (min – máx)
SALINA	0 (0-0)
IRI 75	4 (0-4)***
EVE 3	1 (0-1)
IRI 45	0 (0-2)
IRI 45 + EVE	2 (0-4)

Os dados representam mediana, mínima e máxima. \*\*\* $P=0,03$  representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite intestinal pelo IRI 75 em relação àqueles tratados com salina (teste Mann-Whitney).

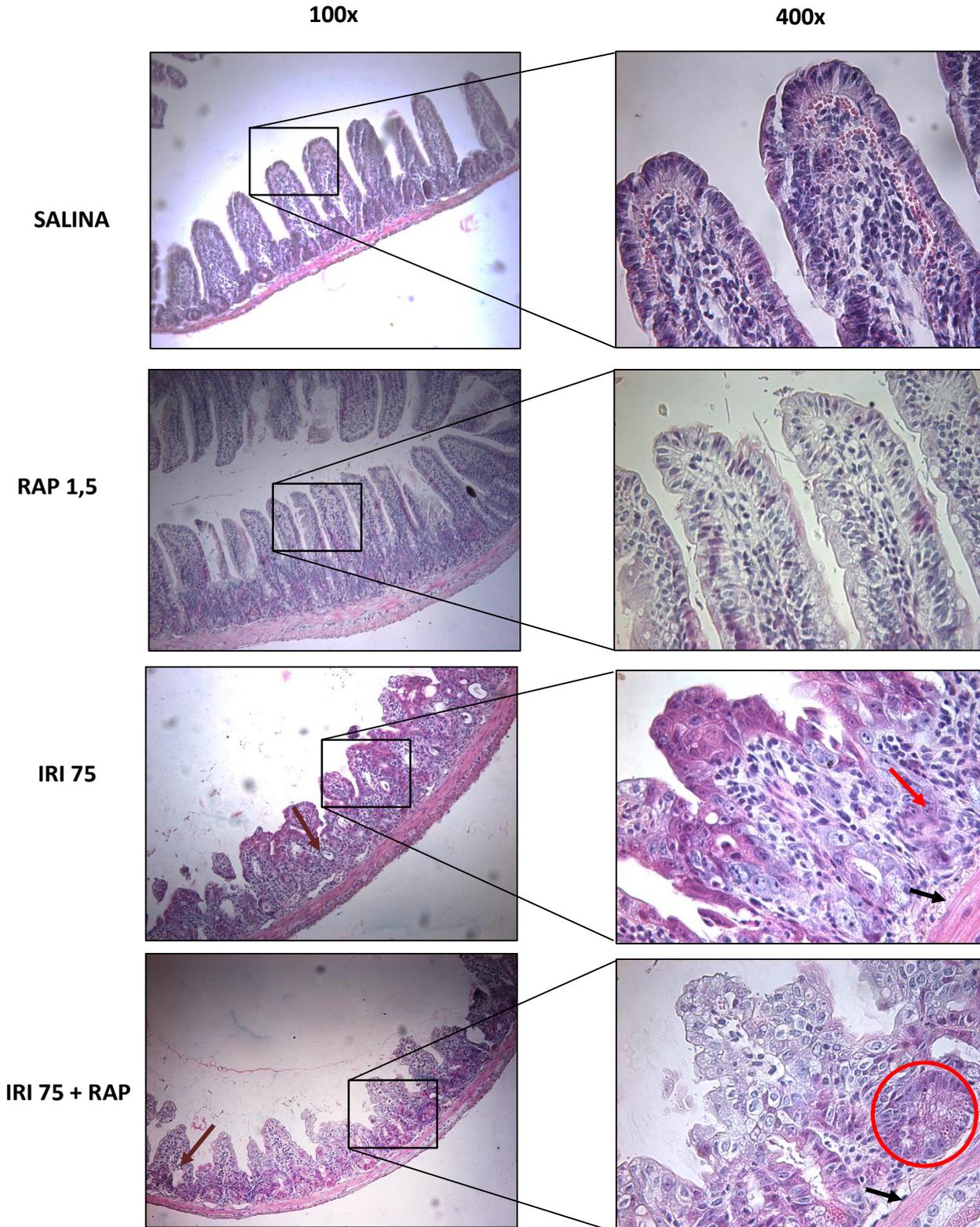


O fato dos grupos experimentais terem um “n” pequeno explica em parte a não significância estatística para as análises dos escores para diarreia. Mas percebe-se, de maneira mais clara, que a inibição do mTOR com rapamicina ou everolimo, de fato, tem tido uma tendência no agravamento da mucosite intestinal. Sabe-se que a diarreia é devido em parte as alterações ocorridas a nível estrutural do arranjo intestinal. Dessa forma, o próximo passo foi analisar os aspectos histopatológicos e morfométricos do íleo dos animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano para corroborar nossa hipótese.

#### **4.2.3. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO ÍLEO DE ANIMAIS SUBMETIDOS A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

As fotomicrografias (**FIGURA 17**, **FIGURA 20** e **FIGURA 23**) e os escores histopatológicos (**FIGURA 18** e **TABELAS 5, 6 e 7**) indicam que o irinotecano na dose de 75 mg/kg é capaz de induzir uma forte alteração na arquitetura de criptas e vilos intestinais tanto em 5 quanto em 7 dias, evidenciando achatamento dos vilos com presença de células vacuolizadas (seta marrom), necrose e apoptose de células da cripta, edema (seta preta), além de uma intensa infiltração de neutrófilos (seta vermelha). A rapamicina quando dada sozinha não alterou a estrutura histológica do íleo dos animais, apresentando-se semelhante aos animais que receberam somente salina. O pré-tratamento com rapamicina 1,5 mg/kg em camundongos que receberam irinotecano 75 mg/kg também mostrou células vacuolizadas (seta marrom) e edema (seta preta), no entanto, revelou de forma muito discreta uma hipertrofia das células de Paneth (círculo vermelho) (**FIG. 17**). Esta alteração ficou muito mais evidente quando da inibição do mTOR com everolimo em 7 dias de mucosite (**FIG. 23**).

**FIGURA 17. Irinotecano 75 mg/kg promove lesão intestinal em camundongos C57BL/6**



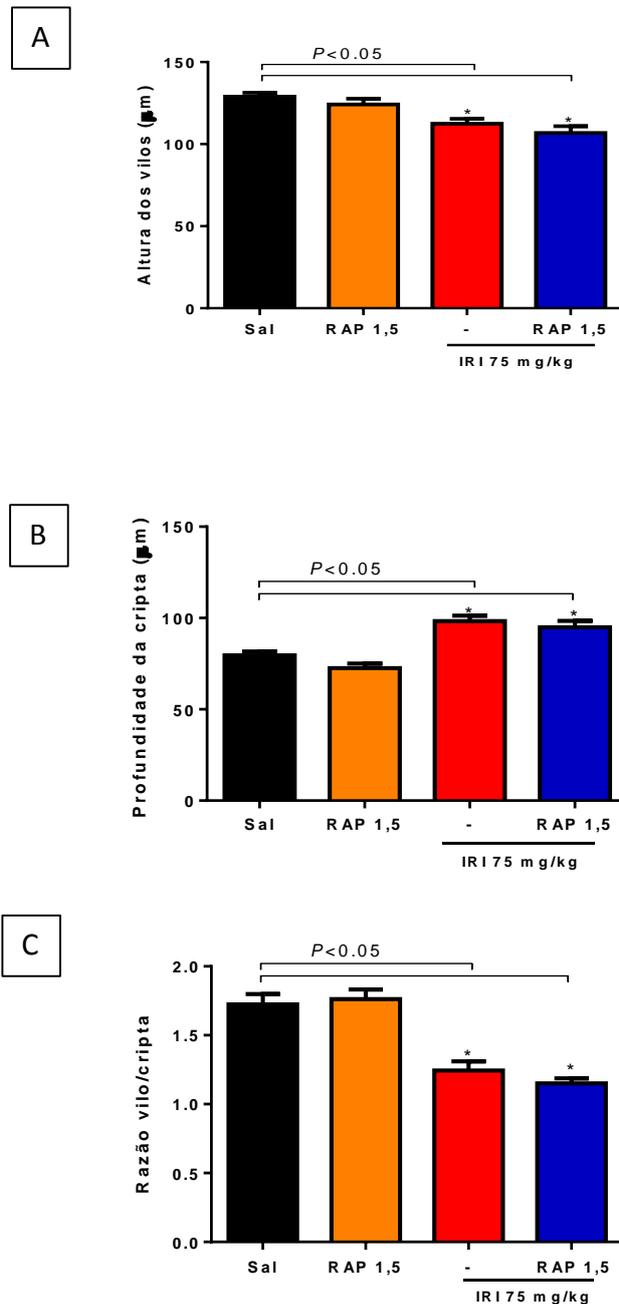
Aspecto microscópico do íleo de animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano 75 mg/kg durante 5 dias. Os animais (n=6/grupo) receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) ou rapamicina (1,5 mg/kg, i.p.). Observa-se que o tratamento com irinotecano causa uma alteração morfológica evidenciando células vacuolizadas (seta marrom), infiltrado de neutrófilos (seta vermelha) e edema (seta preta). O pré-tratamento com rapamicina revelou uma discreta hipertrofia das células de Paneth (círculo vermelho).

A representação gráfica dos escores histopatológicos de Macpherson & Pfeiffer para os animais submetidos a mucosite intestinal com irinotecano 75 mg/kg em 5 dias é mostrada na **FIGURA 18** e **TABELA 5**. O irinotecano 75 mg/kg, como já observado nos aspectos microscópicos, aumentou os escores histopatológicos de maneira significativa (2[1,3]) quando comparado com o grupo salina (0[0,0]). O pré-tratamento com rapamicina não alterou significativamente este parâmetro (2[1,2]). Da mesma forma que a rapamicina quando administrada isoladamente (0[0,1]).



Realizando-se análise morfométrica no íleo de camundongos C57BL/6 tratados com irinotecano na dose de 75 mg/kg durante 5 dias, verificou-se que o irinotecano nesta dose reduziu a altura dos vilos [média( $\mu\text{m}$ )=112,5 $\pm$ 2,9] aumentou a profundidade da cripta [média( $\mu\text{m}$ )=98,3 $\pm$ 3,1] e consenquentemente reduziu a razão vilo/cripta [média( $\mu\text{m}$ )=1,24 $\pm$ 0,07] de maneira significativa ( $P<0,05$ ) quando comparado com o grupo controle que recebeu somente salina [média( $\mu\text{m}$ )=128,9 $\pm$ 2,5; 79,5 $\pm$ 2,2; 1,72 $\pm$ 0,08, respectivamente] (**FIGURA 19 A, B e C**). O pré-tratamento com rapamicina 1,5 mg/kg ou esta droga dada de forma isolada não alterou a morfometria.

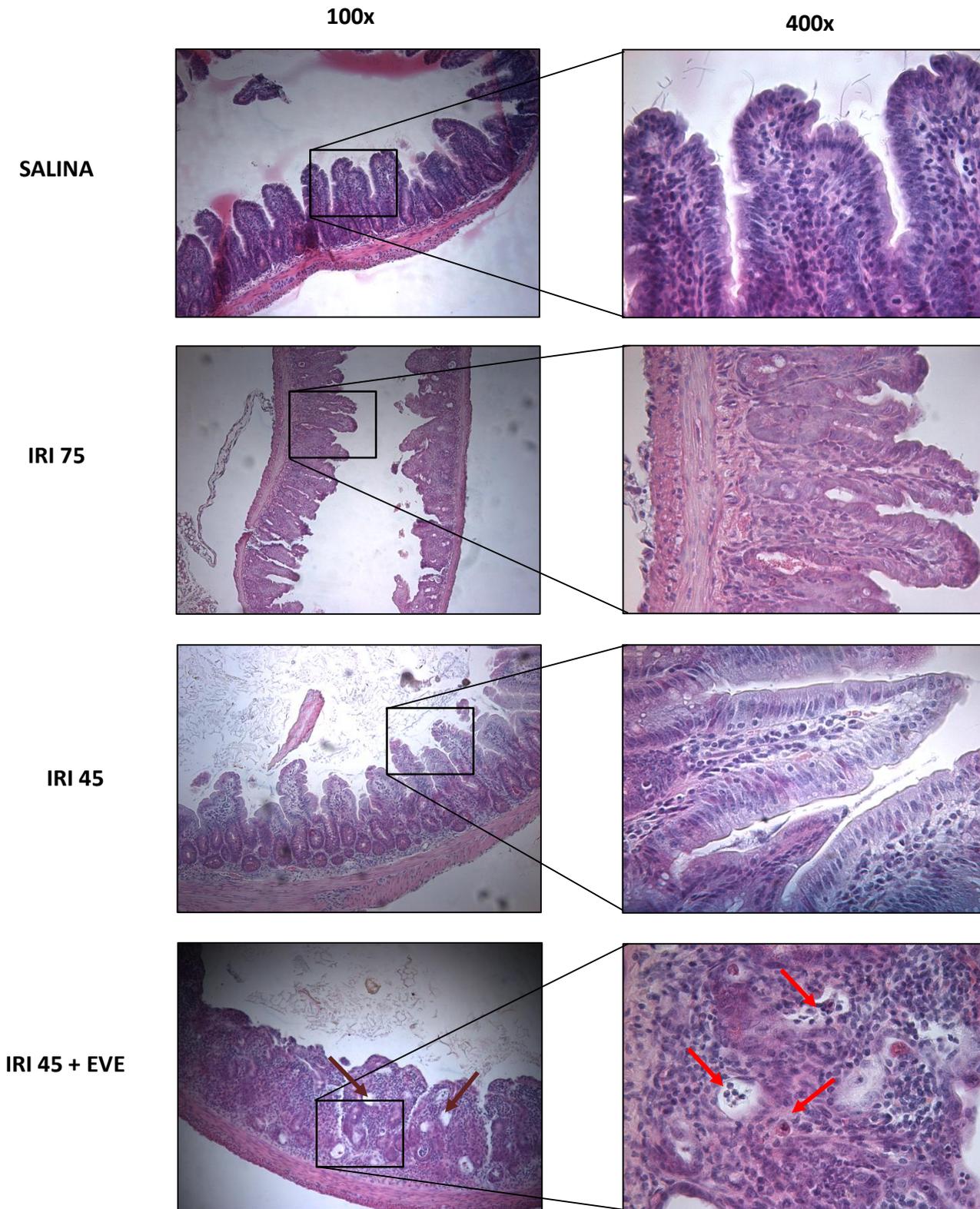
**FIGURA 19. Irinotecano 75 mg/kg altera a morfometria em íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal**



Os animais receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram tratados com rapamicina (1,5 mg/kg, i.p.). A eutanásia foi realizada no quinto dia experimental. Segmentos de íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E (40x e 100x) para posterior análise morfométrica. A figura revela que o IRI 75 mg/kg induz uma significativa redução da altura dos vilos (A), aumento da profundidade das criptas (B) e redução da razão vilos/cripta (C) quando comparado com os camundongos injetados apenas com salina (controle). Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  vs grupo salina e RAP 1,5. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Analisando-se a dose de irinotecano 45 mg/kg com 7 dias experimentais, percebe-se que não há alteração significativa em relação à arquitetura intestinal (**FIGURA 20**) quando comparado ao grupo controle que recebeu somente salina. No entanto, quando os animais que foram injetados com a sub-dose de irinotecano receberam um pré-tratamento com o inibidor de mTOR disponível no mercado para o tratamento de diversas neoplasias, everolimus, notou-se uma exacerbação da lesão evidenciada na fotomicrografia (**FIGURA 17**) que se assemelha com aquela lesão observada na dose padrão de irinotecano. Da mesma forma nos escores histopatológicos revelou-se que há uma exacerbação da lesão com o everolimus associado ao irinotecano na dose de 45 mg/kg (**FIGURA 18 e TABELA 6**).

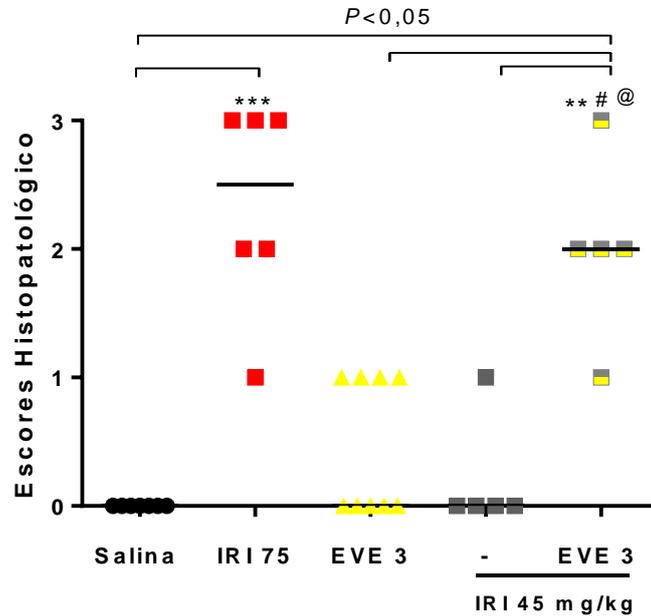
**FIGURA 20. O everolimo promove uma exacerbação da lesão observado na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg no íleo de camundongos C57BL/6**



Aspecto microscópico do íleo de animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano 75 mg/kg e 45 mg/kg durante 7 dias. Os animais (n=6/grupo) receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p. ou 45 mg/kg, i.p.) ou everolimo (3 mg/kg, v.o.). A sub-dose de irinotecano 45 mg/kg não altera a morfologia. No entanto, ao pré-tratar o animal com everolimo evidencia-se células vacuolizadas (setas marrom) e infiltrado de neutrófilos (setas vermelha).

Assim como nas fotomicrografias, pode-se notar que a sub-dose de irinotecano 45 mg/kg não alterou significativamente os escores histopatológicos (0[0,1]). Contudo, o pré-tratamento com everolimo 3 mg/kg aumentou esses escores de maneira significativa em camundongos que receberam uma sub-dose de irinotecano 45 mg/kg (2[1,3]) (**FIGURA 21 e TABELA 6**).

**FIGURA 21. Everolimo aumenta os escores histopatológicos na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg no íleo de camundongos C57BL/6**



A figura mostra que o IRI 75 mg/kg induziu um aumento dos escores histopatológicos no íleo quando comparado com os camundongos que receberam apenas salina. Os animais (n=6/grupo) que foram pré-tratados com everolimo e que receberam uma sub-dose de irinotecano (45 mg/kg i.p.) tiveram a mediana aumentada de maneira significativa. Os dados mostram a mediana dos escores histopatológicos. \* $P < 0,05$  vs grupo Salina, # $P < 0,05$  vs EVE 3, @ $P < 0,05$  vs IRI 45. Para análise estatística utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

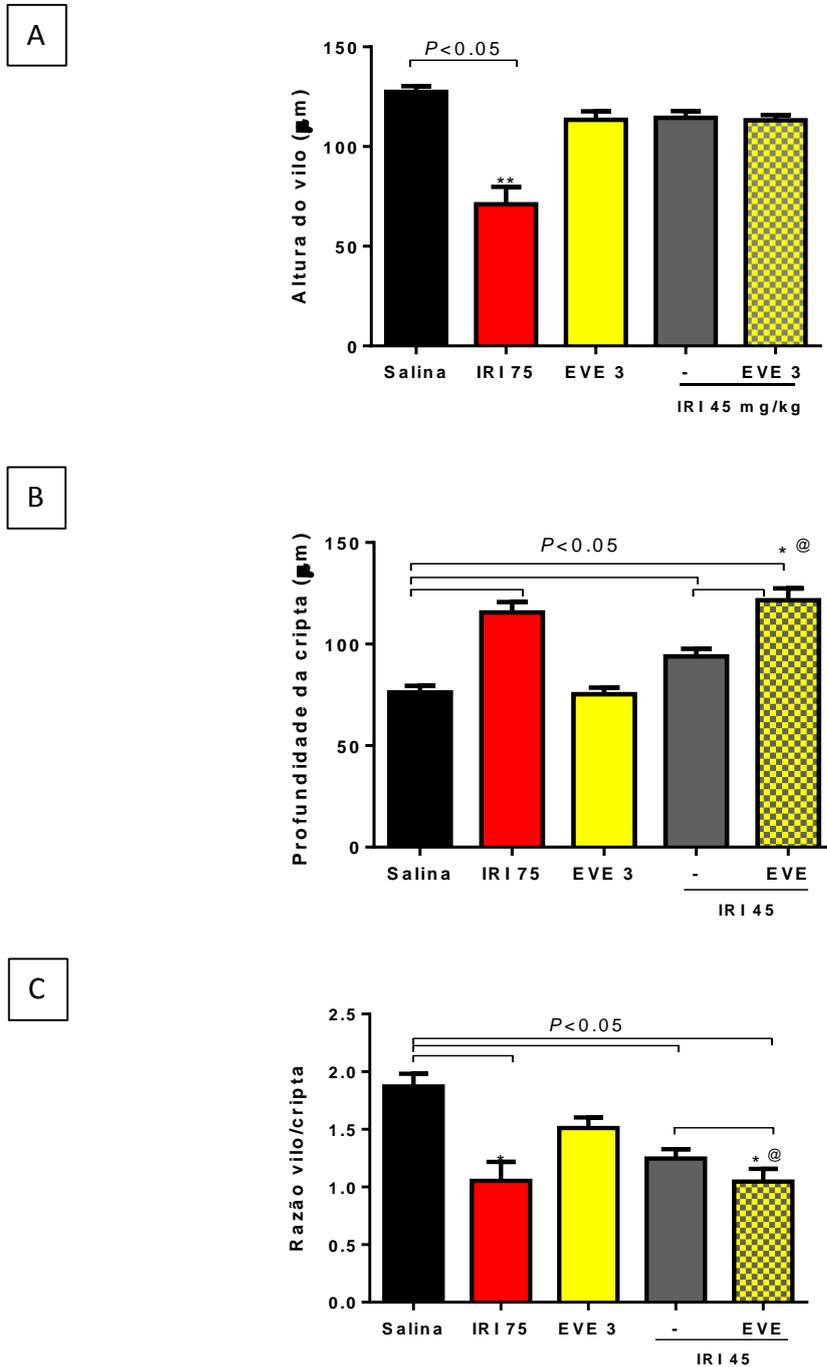
**TABELA 6. Avaliação histopatológica de animais submetidos a mucosite intestinal e tratados com everolimo na sub-dose de irinotecano (7dias)**

Escores Histopatológicos	
Grupos	Mediana (min – máx)
Salina	0 (0-0)
IRI 75	2,5 (1-3) <sup>***</sup>
EVE	0 (0-1)
IRI 45	0 (0-1)
IRI 45 + EVE	2 (1-3) <sup>**</sup>

Os dados representam mediana, mínima e máxima. \* $P < 0,05$  representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite intestinal pelo IRI 75 em relação aqueles tratados com Salina (Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

A observação da análise morfométrica revela que a sub-dose de irinotecano 45 mg/kg não alterou a altura do vilo e pouco modificou a profundidade da cripta [média( $\mu\text{m}$ )=93,99  $\pm$ 3,7] quando comparado ao grupo que recebeu somente veiculo [média( $\mu\text{m}$ )=76,14 $\pm$ 3,3] (**FIGURA 22 B**). O pré-tratamento com everolimo nos animais que receberam a sub-dose de irinotecano (45 mg/kg) intensificou o processo estrutural da lesão, aumentando a profundidade da cripta [média( $\mu\text{m}$ )=121,5 $\pm$ 5,9) e diminuindo a razão vilo/cripta [média=1,046 $\pm$ 0,11] assemelhando-se aos resultados encontrados no grupo que recebeu o irinotecano 75mg/kg [médias( $\mu\text{m}$ )=115,6 $\pm$ 5,1 e 1,052 $\pm$ 0,17, respectivamente] (**FIGURA 22 B e C**).

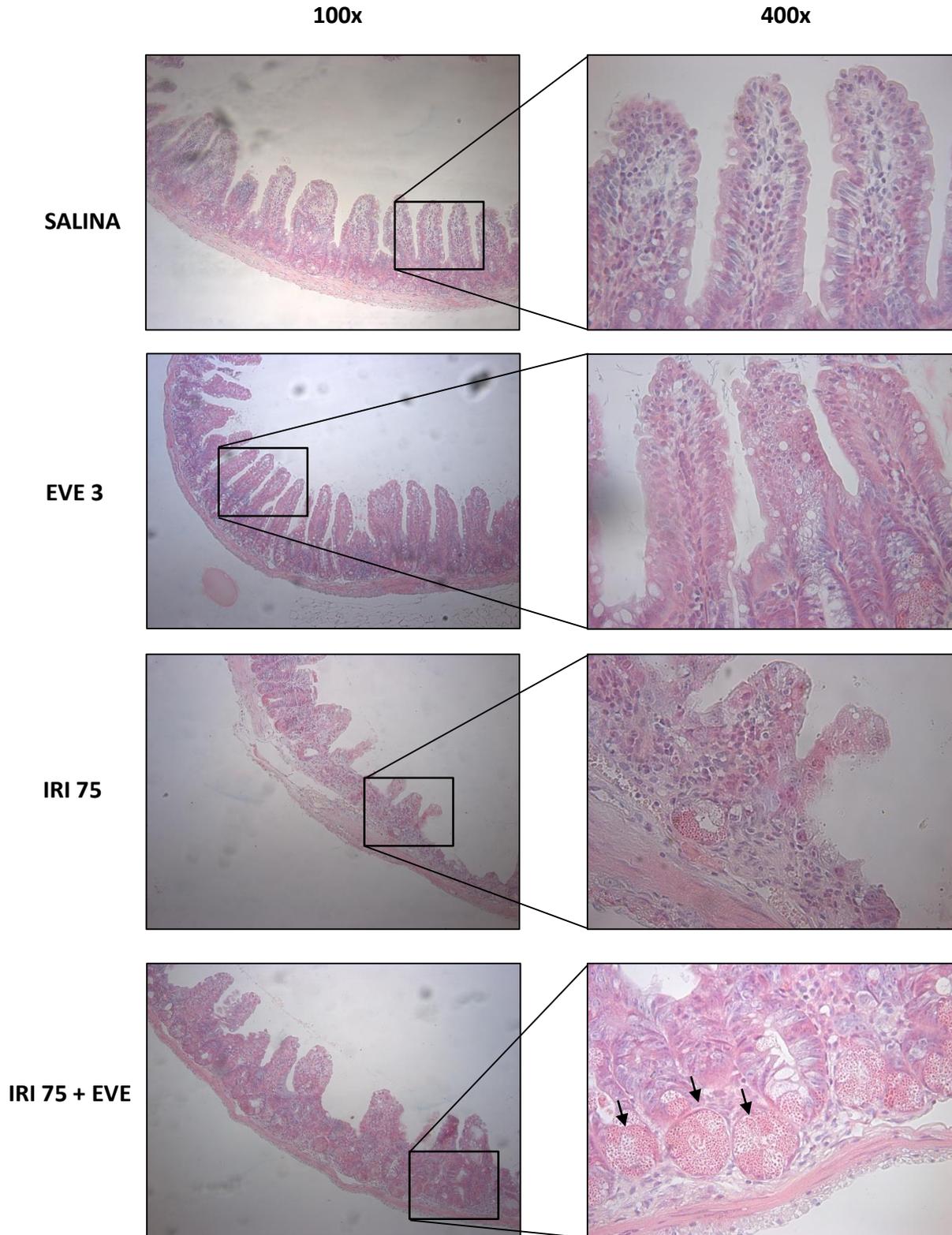
**FIGURA 22. Everolimo intensifica o dano estrutural na sub-dose de irinotecano 45 mg/kg no íleo de camundongos C57BL/6**



Os animais receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p. ou 45 mg/kg, i.p.) durante quatro dias e everolimo (3 mg/kg v.o.) durante seis dias. Foram eutanasiados no sétimo dia experimental. Segmentos de íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E (100x) para posterior análise morfométrica. A figura revela que o IRI 75 e IRI 45 induzem uma redução da razão vilão/cripta (C) quando comparada com camundongos injetados apenas com salina ou EVE 3. O pré-tratamento com everolimo recuperou a razão vilão/cripta. Os valores representam a média  $\pm$  EPM. \* $P < 0,05$  vs grupo Salina. § $P < 0,05$  vs IRI 45 + EVE 3. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

O pré-tratamento de everolimo nos animais que receberam a dose padrão de irinotecano 75 mg/kg no modelo de sete dias experimentais mostrou que houve exacerbação da lesão da mucosa intestinal evidenciada pela hipertrofia das células de Paneth (seta preta) (**FIGURA 23**). O mesmo não acontece após a administração isolada do everolimo, pois não ocorre alteração da morfologia intestinal.

**FIGURA 23. Everolimo induziu hipertrofia de células de Paneth no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal por irinotecano 75 mg/kg em 7 dias**

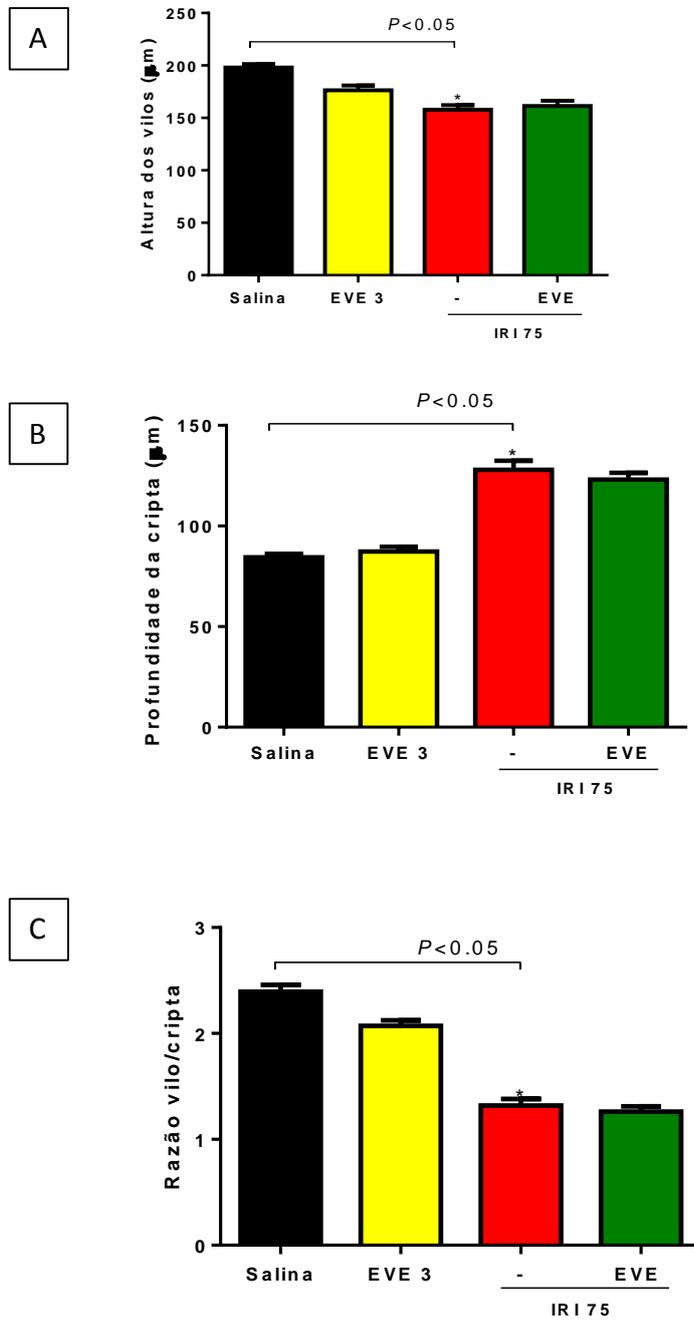


Aspecto microscópico do íleo de animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano 75 mg/kg durante 7 dias. Os animais (n=6/grupo) receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p) e foram tratados com everolimo (3 mg/kg, v.o.). O pré-tratamento com everolimo evidenciou hipertrofia das células de Paneth (setas preta).



O pré-tratamento com everolimo na dose padrão de irinotecano (75mg/kg) não alterou nenhum parâmetro estrutural dos aspectos morfométricos: altura dos vilos [média( $\mu\text{m}$ )=176,3 $\pm$ 4,6] (**FIGURA 25 A**), profundidade da cripta [média( $\mu\text{m}$ )=87,3 $\pm$ 2,4] (**FIGURA 25 B**) e razão vilo/cripta (média=2,1 $\pm$ 0,05) (**FIGURA 25 C**) quando comparado ao grupo controle negativo para a lesão intestinal que recebeu somente veículo (salina) [média=198 $\pm$ 3,5; 84,5 $\pm$ 1,7; 2,3 $\pm$ 0,07], respectivamente.

**FIGURA 25. Everolimo não altera o aspecto morfométrico no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal com irinotecano 75 mg/kg**



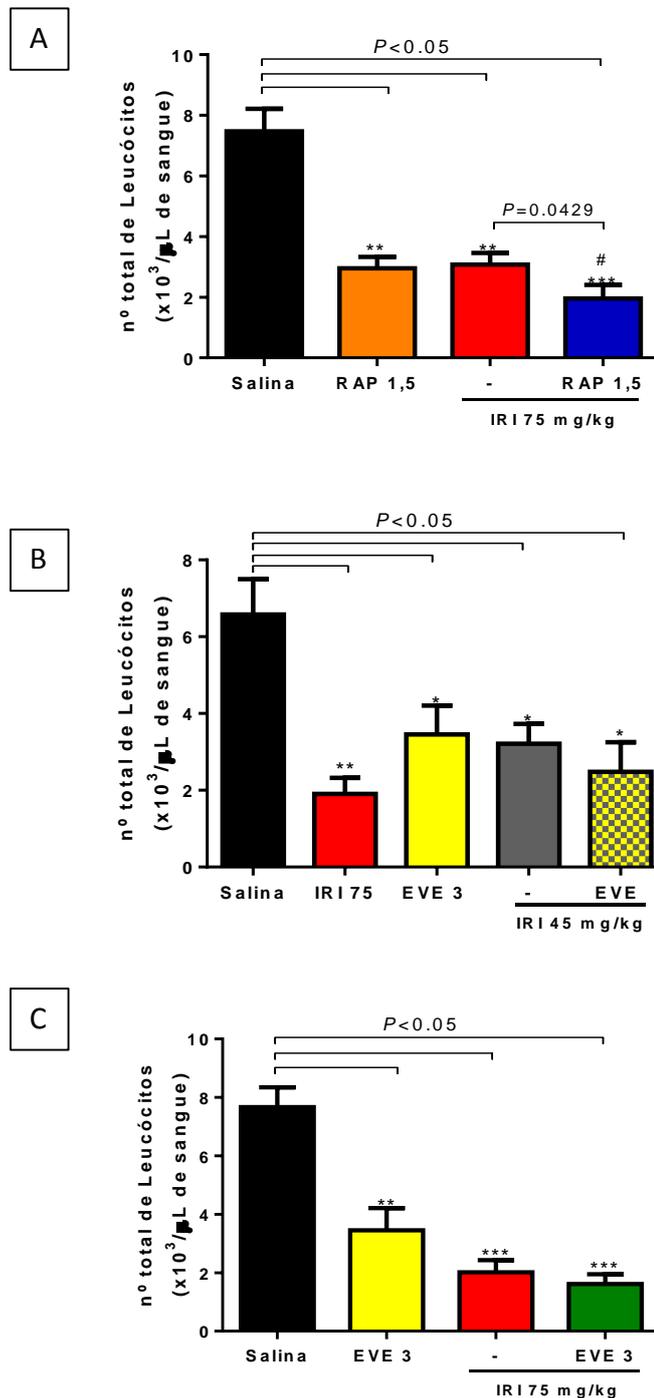
Os animais receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram tratados com everolimo (3 mg/kg, v.o) durante 6 dias. A eutanásia foi realizada no sétimo dia experimental. Segmentos de íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E (100x) para posterior análise morfométrica. A figura mostra que o IRI 75 induz uma significativa redução da altura dos vilos (A), aumento da profundidade das criptas (B) e redução da razão vilos/cripta (C) quando comparada com camundongos injetados apenas com salina. O pré-tratamento com everolimo melhorou este aspecto morfométrico de maneira significativa. Os valores representam a média ± EPM. \* $P < 0,05$  vs grupo salina. # $P < 0,05$  vs grupo IRI 75. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Para finalizar a avaliação da mucosite intestinal por meio de parâmetros gerais, realizou-se a análise da leucopenia induzida pelo uso do irinotecano e dos inibidores de mTOR.

#### 4.2.4. AVALIAÇÃO DA CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS

A **FIGURA 26** mostra os resultados da contagem total de leucócitos com cinco dias experimentais (**A**) e sete dias (**B** e **C**). Assim como era esperado para os antineoplásicos, o irinotecano desenvolveu uma leucopenia significativa ( $P < 0,05$ ) em todas as doses (45 mg/kg e 75 mg/kg) [média=3,1±0,4 (IRI 75-5 dias); 1,9±0,4 (IRI 75-7 dias); 3,2±0,5 (IRI 45-7 dias) quando comparado ao grupo salina [média=7,5±0,74 (5 dias) e 7,7±0,7 (7 dias)]. Da mesma forma, os inibidores de mTOR, rapamicina e everolimo, por terem atividade imunossupressora diminuíram significativamente a contagem total de leucócitos tanto quando administrados de forma isolada quanto em combinação com irinotecano. No entanto, observou-se um aumento significativo na leucopenia quando a rapamicina 1,5 mg/kg (média=2±0,4) foi dada em animais que já tinham sido injetados com irinotecano 75 mg/kg (média=3,1±0,4) no modelo de mucosite intestinal com 5 dias.

**FIGURA 26. Irinotecano e inibidores de mTOR causam leucopenia em camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal**



Os animais receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p. ou 45 mg/kg, i.p.) e foram tratados com rapamicina (1,5 mg/kg i.p.) durante 4 dias ou everolimo (3 mg/kg, v.o.) durante 6 dias. Os animais foram eutanasiados no quinto ou sétimo dia experimental. A figura apresenta o efeito do irinotecano (45 e 75 mg/kg), rapamicina 1,5 mg/kg e everolimo 3 mg/kg em diminuir o número total de leucócitos circulantes. (A) animais submetidos ao tratamento com irinotecano e rapamicina (5 dias). (B) animais submetidos ao tratamento com everolimo na sub-dose de irinotecano (45 mg/kg). (C) Animais submetidos ao tratamento com everolimo na dose padrão de irinotecano (75 mg/kg) (7 dias). Os valores representam a média ± EPM do número de Leucócitos totais por 10<sup>3</sup>/μL. \* $P < 0,05$  vs animal tratado com Salina. # $P$  vs RAP + IRI 75 ou EVE + IRI 75. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

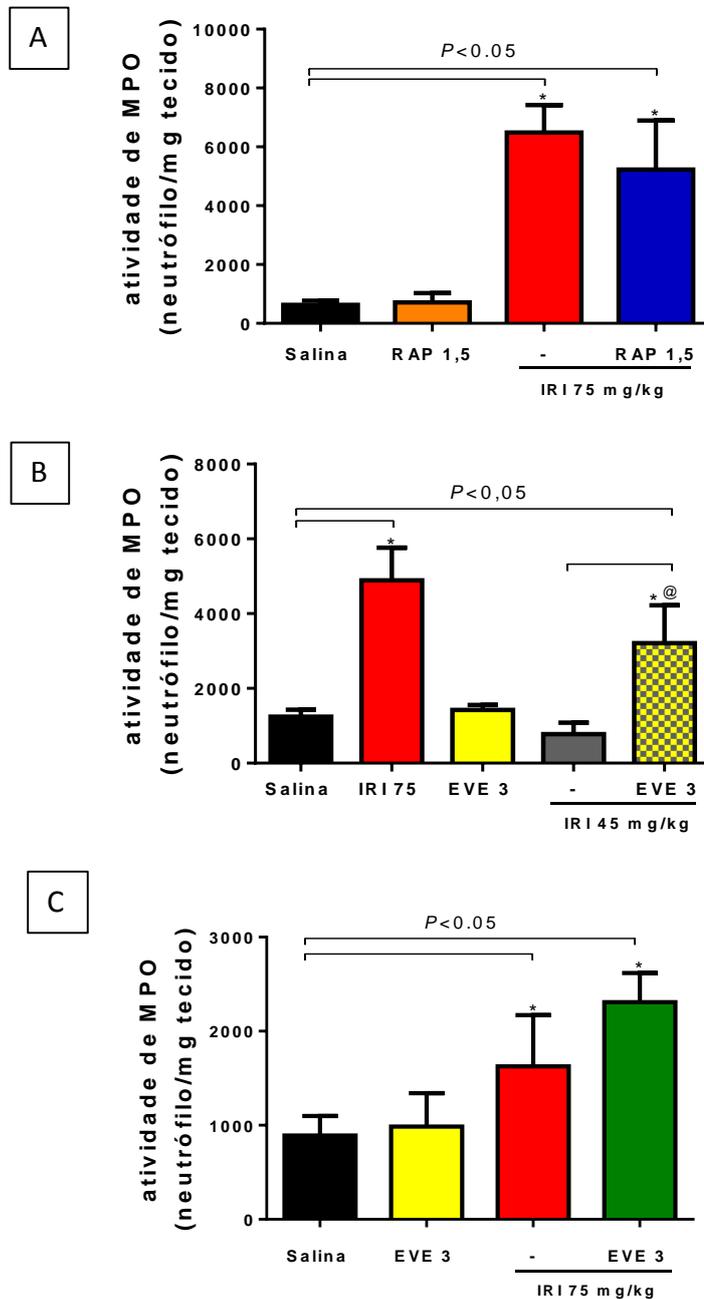
O próximo passo era investigar a modulação farmacológica com inibidores de mTOR (rapamicina e everolimo) na mucosite intestinal induzida por irinotecano por meio de parâmetros inflamatórios. Para isso foi realizado o ensaio de atividade da mieloperoxidase (MPO) e por fim a dosagem de citocinas inflamatórias.

### **4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS DA MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO**

#### **4.3.1. EFEITO DO IRINOTECANO E INIBIDORES DE mTOR SOBRE A ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE EM CAMUNDONGOS C57BL/6**

Uma das maneiras de se avaliar o componente inflamatório é através da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase, presente em grânulos azurófilos de neutrófilos e que é um indicador da presença destas células. O efeito pró-inflamatório do irinotecano na dose de 75 mg/kg em 5 dias é revelado pelo aumento significativo ( $P < 0,05$ ) deste parâmetro (média=6490±927) quando comparado ao grupo controle negativo (média=628,1±145,1) (**FIGURA 27 A**) e 7 dias (média=4892±871) (**FIGURA 27 B**). Os inibidores de mTOR quando administrados de forma isolada não alteraram a atividade desta enzima. A sub-dose de irinotecano 45 mg/kg não alterou a atividade da mieloperoxidase (média=780±301,2) quando comparado ao grupo controle negativo que recebeu somente salina (média=1242±190,1). No entanto, quando pré-tratado com um inibidor de mTOR (everolimo 3 mg/kg) este parâmetro foi exacerbado significativamente (média=3209±1015) (**FIGURA 24 B**).

FIGURA 27. Irinotecano 75 mg/kg e everolimo numa sub-dose de irinotecano 45 mg/kg aumentam a atividade de MPO no íleo de camundongos C57BL/6



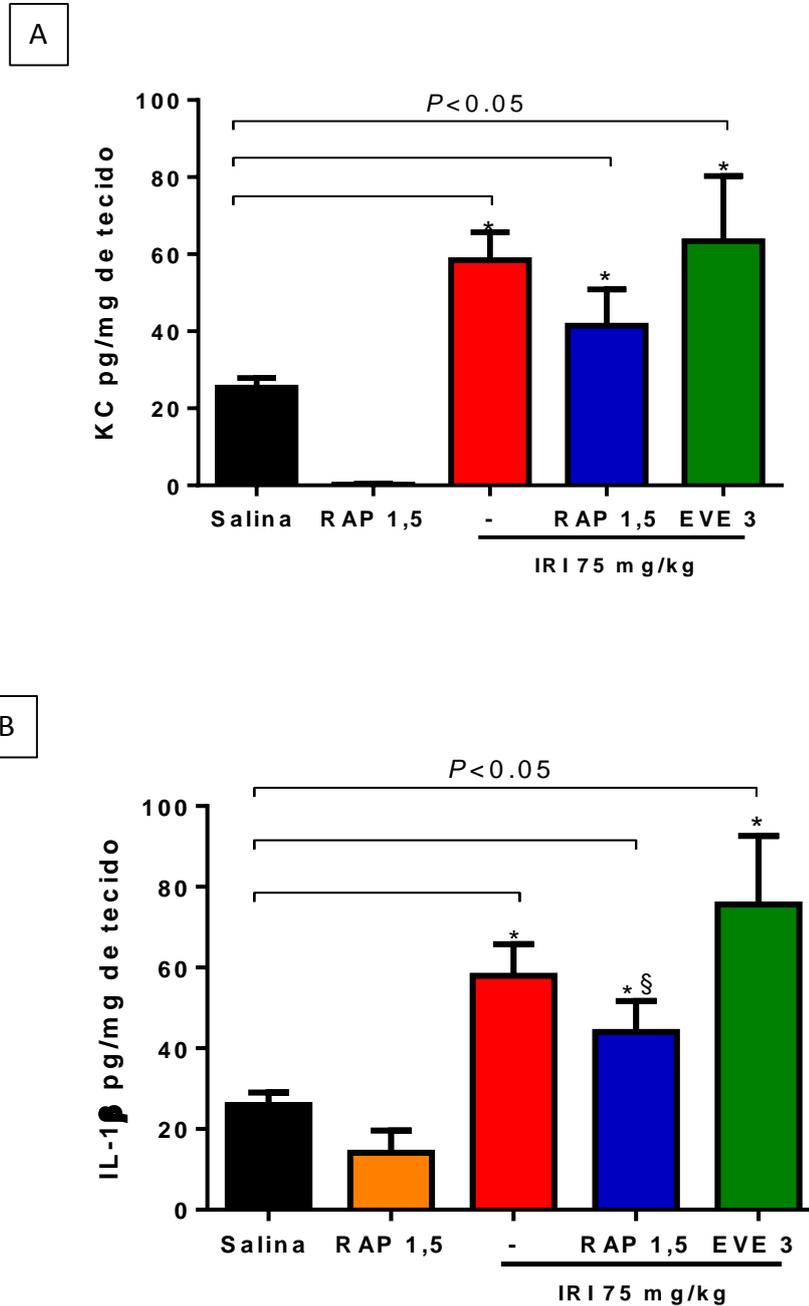
Os animais receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p. ou 45 mg/kg, i.p.) durante 4 dias consecutivos. Foram tratados com rapamicina (1,5 mg/kg i.p.) durante 4 dias e everolimo (3 mg/kg, v.o.) durante 6 dias. A eutanásia foi realizada no quinto ou sétimo dia experimental. Amostras de íleo foram coletados para a determinação do infiltrado neutrofílico através da atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO). A figura mostra que animais injetados com irinotecano 75 mg/kg apresentaram aumento significativo da atividade de MPO no íleo quando comparado com o grupo salina. (A) animais submetidos ao tratamento com irinotecano e rapamicina (5 dias). (B) animais submetidos ao tratamento com sub-dose de irinotecano (45 mg/kg) e everolimo (7 dias). (C) Animais submetidos ao tratamento com irinotecano (75 mg/kg) e everolimo (7 dias). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de atividade de MPO (número de neutrófilos por mg de tecido). \* $P < 0,05$  vs grupo tratado com Salina. @ $P < 0,05$  vs tratado com IRI 45. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Para finalizar os resultados foi realizado a dosagem tecidual de citocinas inflamatórias presentes no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal por irinotecano.

#### **4.3.1. EFEITO DO IRINOTECANO E INIBIDORES DE mTOR SOBRE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM CAMUNDONGOS C57BL/6**

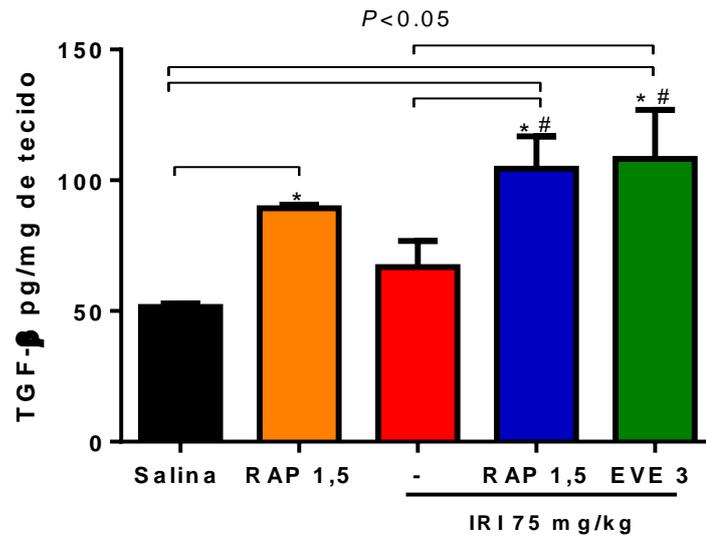
A **FIGURA 28** mostra a concentração tecidual da quimiocina análoga da interleucina 8 humana em camundongos (KC), interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator transformador do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos a mucosite intestinal por irinotecano e tratados com rapamicina ou everolimo (inibidores de mTOR). O irinotecano na dose de 75 mg/kg aumentou significativamente ( $P<0,05$ ), com exceção do TGF- $\beta$ , o nível tecidual de todas as citocinas analisadas (média KC=58,5 $\pm$ 7,2; IL-1 $\beta$ =58 $\pm$ 7,8 e IFN- $\gamma$ =2,1 $\pm$ 0,76) quando comparado ao grupo salina (média (KC)=25,4 $\pm$ 2,5; IL-1 $\beta$ =26 $\pm$ 3,1 e IFN- $\gamma$ =0,83 $\pm$ 0,14). A administração de forma isolada do inibidor de mTOR clássico, rapamicina, aumentou o nível tecidual de TGF- $\beta$  significativamente (média=89,3 $\pm$ 1,3) quando comparado ao grupo salina (média=52 $\pm$ 1,4). Quando se analisa o resultado do pré-tratamento dos inibidores de mTOR (rapamicina e everolimo) nos animais que receberam irinotecano 75 mg/kg nota-se que não há diferença estatística significativa em relação ao grupo controle positivo (irinotecano 75 mg/kg) nos níveis teciduais de KC [média (IRI 75 + RAP)=41,5 $\pm$ 9,4; (IRI 75 + EVE)= 63,4 $\pm$ 16,9] e IL-1 $\beta$  [média (IRI 75 + RAP)=44 $\pm$ 7,7; (IRI 75 + EVE)=76 $\pm$ 17)]. Entretanto, observa-se uma exacerbação de maneira significativa dos níveis de TGF- $\beta$  [média (IRI 75 + RAP)=104,5 $\pm$ 12,3; (IRI 75 + EVE)=108,2 $\pm$ 19)] e IFN- $\gamma$  (média (IRI 75 + RAP)=3,9 $\pm$ 0,76; (IRI 75 + EVE)=5,7 $\pm$ 0,75)] quando comparado ao grupo que recebeu somente irinotecano 75 mg/kg [média (TGF- $\beta$ )=67 $\pm$ 10; média (IFN- $\gamma$ )=2,1 $\pm$ 0,76)].

**FIGURA 28. Irinotecano 75 mg/kg em combinação com inibidores de mTOR aumentam o nível de citocinas inflamatórias no fígado de camundongos C57BL/6**

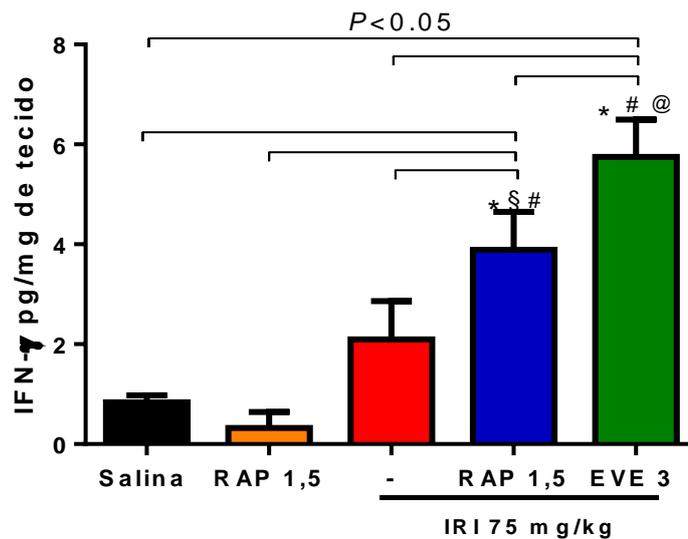


Os animais receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) e foram tratados com rapamicina (1,5 mg/kg i.p.) durante 4 dias ou everolimus (3 mg/kg, v.o) durante 6 dias. A eutanásia foi realizada no quinto ou sétimo dia experimental. Amostras de fígado foram coletados para a determinação dos níveis teciduais das citocinas KC (A) e IL-1 $\beta$  (B). A detecção de KC, IL-1 $\beta$  foi determinada por ELISA. \* $P < 0,05$  vs salina. § $P < 0,05$  vs RAP. # $P < 0,05$  vs IRI 75. @ $P < 0,05$  vs IRI 75 + RAP. Diferenças estatísticas utilizando-se ANOVA seguido de Bonferroni.

C



D



Os animais receberam salina (10 mL/kg, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) e foram tratados com rapamicina (1,5 mg/kg i.p.) durante 4 dias ou everolimus (3 mg/kg, v.o) durante 6 dias. A eutanásia foi realizada no quinto ou sétimo dia experimental. Amostras de fígado foram coletadas para a determinação dos níveis teciduais das citocinas TGF- $\beta$  (C) e IFN- $\gamma$  (D). A detecção de TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  foi determinada por ELISA. \* $P < 0,05$  vs salina. § $P < 0,05$  vs RAP. # $P < 0,05$  vs IRI 75. @ $P < 0,05$  vs IRI 75 + RAP. Diferenças estatísticas utilizando-se ANOVA seguido de Bonferroni.

---

## **DISCUSSÃO**

---

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho se propôs a investigar o efeito da inibição do mTOR sobre a mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano em camundongos C57BL/6. Os resultados mostraram que o irinotecano na dose de 75 mg/kg foi capaz de induzir um significativo dano sobre o trato gastrointestinal evidenciando sua toxicidade através de alterações como: redução da massa corpórea acompanhado de diarreia severa, desarranjo na arquitetura intestinal com encurtamento e achatamento dos vilos com presença de células vacuolizadas e achatadas, necrose e apoptose das células da cripta, edema e intensa infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares (neutrófilos), além de um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (KC e IL-1 $\beta$ ) no íleo. Contudo, a inibição direta do mTOR através da rapamicina e seu análogo comercial, disponível para uso clínico, everolimo, não foi capaz de reverter esse dano intestinal como inicialmente hipotetizávamos. De forma surpreendente a inibição do mTOR com rapamicina no modelo de 5 dias mostrou uma tendência ao agravamento da lesão intestinal. Este fato ficou muito evidente após expansão do modelo experimental para 7 dias e com a inibição do mTOR com everolimo numa sub-dose de irinotecano 45 mg/kg (que normalmente não é capaz de induzir uma mucosite intestinal). O pré-tratamento com everolimo 3 mg/kg exacerbou a lesão conforme observado pelo aumento da perda ponderal, aumento nos escores de diarreia seguido da destruição da arquitetura intestinal, tornando-se semelhante àquela toxicidade induzida pelo irinotecano 75 mg/kg. Além disso, evidenciou-se um aumento nos eventos inflamatórios com o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (marcador da infiltração de neutrófilos), bem como um aumento no nível tecidual de TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ . A inibição do mTOR com rapamicina e everolimo na mucosite intestinal induzida por irinotecano proporcionou uma alteração histopatológica nunca antes vista nesse modelo que foi a hipertrofia das células de Paneth. Em face dos resultados do presente trabalho, elaboramos uma nova hipótese para o efeito da inibição do mTOR na mucosite intestinal induzida por irinotecano que está representada esquematicamente na **FIGURA 29**.

Corroborando com nossos achados, Melo e colaboradores (2008) demonstraram que a lesão induzida por irinotecano era acompanhada de uma perda de peso significativa cursando com uma diarreia grave, aumento de células polimorfonucleares no intestino (caracterizado pelo aumento do MPO), dano histopatológico além do desarranjo estrutural notório evidenciando a diminuição da altura dos vilos e aumento da profundidade da cripta. Os resultados do presente trabalho referentes ao dano causado pelo irinotecano na dose de 75

mg/kg estão de acordo com os achados dos trabalhos desenvolvidos no LAFICA (MELO *et al*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al*, 2012; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al*, 2015) além de pesquisadores de outros grupos (IKUNO *et al*, 1995; KURITA *et al*, 2000; GIBSON *et al* 2003, 2007; LOGAN *et al*, 2008a, b; STRINGER *et al*, 2007b, 2009a, ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014).

O eixo PI3K/Akt/mTOR, objeto de estudo deste trabalho, tem como ponto importante na sua ativação os receptores *Toll-like* (TLRs). Estes são receptores de reconhecimento de padrão (PRR, do inglês, *Pattern-Recognition Receptors*) responsáveis por reconhecer, por exemplo, padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) presentes em bactérias. Desta forma, servem como um elo importante entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. (SCHAEFER, 2014). Os resultados do presente trabalho evidenciaram um aumento na expressão gênica do RNAm da via PI3K/Akt/mTOR após a indução da mucosite por irinotecano 75 mg/kg. Diante deste dado surgiu o questionamento se uma possível modulação farmacológica do mTOR seria um alvo terapêutico na toxicidade da quimioterapia.

Sabendo que a escolha da dose é uma etapa limitante em um procedimento experimental e pelo fato de nunca ter sido realizado a inibição do mTOR na mucosite intestinal pelo irinotecano, a escolha da dose da rapamicina (1,5 mg/kg) foi baseada em trabalhos como de Farkas e colaboradores (2006) que observaram uma melhora no modelo de colite crônica induzida por dextrana sulfato de sódio (DSS) evidenciada pela diminuição da migração de neutrófilos *in vivo*. A conclusão do trabalho de Farkas é que o tratamento a curto prazo com rapamicina reduz o grau da lesão em camundongos com colite crônica (FARKAS *et al.*, 2006). Outros trabalhos utilizaram uma dose de rapamicina maior como no caso de Mushaben *et al.*, 2013 (4 mg/kg) e concluíram que a inibição do mTOR com rapamicina, num modelo já estabelecido de asma alérgica induzida por ácaro, foi capaz de suprimir algumas características-chave como presença de células caliciformes e células T CD4<sup>+</sup> incluindo-se, células T regulatórias, efêoras e ativadas no tecido pulmonar. O papel da sinalização do mTOR durante a fase precoce da asma alérgica é crítico, no entanto, uma vez que a doença já está estabelecida é muito limitada (MUSHABEN *et al.*, 2013). Já a dose de everolimo foi escolhida com base em um experimento curva dose-resposta (dado não mostrado) em que a dose de 3 mg/kg foi a que melhor respondeu, visto que as outras duas doses (10 e 30 mg/kg) levaram a mortalidade completa de todos os animais do grupo, possivelmente pela exacerbação excessiva da lesão já instaurada pelo irinotecano. A dose inicial de 3 mg/kg foi baseada no trabalho de Matsuda e

colaboradores (2007) que observaram o efeito terapêutico do everolimo na colite induzida por DSS em camundongos *knock-out* para interleucina-10 (MATUSDA *et al.*, 2007).

A hipótese inicial para este trabalho era que a inibição do mTOR pudesse prevenir os danos causados pela administração do irinotecano, uma vez que a expressão do RNAm do mTOR está elevado em camundongos tratados com este quimioterápico. No entanto, o que foi observado é que a inibição do mTOR com rapamicina e seu análogo, everolimo, exacerbou o processo inflamatório na mucosite intestinal e ficou bem evidente quando o everolimo foi dado num protocolo de 7 dias com uma sub-dose de irinotecano 45 mg/kg que não é capaz de induzir uma mucosite e esta modulação farmacológica mostrou claramente o agravamento da lesão. Uma possível explicação para o aumento da expressão gênica do RNAm do mTOR na mucosite é que o mTORC1 é extremamente importante para a proliferação de células epiteliais intestinais, células estas que estão danificadas com o processo inflamatório decorrente da toxicidade do irinotecano e seu metabólito ativo SN-38. Então o que deve estar ocorrendo a nível intestinal é uma tentativa do organismo de restabelecer a homeostase aumentando a síntese de mTOR para que uma vez ativo promova a proliferação e diferenciação das células epiteliais intestinais.

O aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (importante marcador da presença de neutrófilos) na mucosite intestinal induzida por irinotecano já está bem estabelecida (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015). No presente trabalho vemos que a inibição do mTOR com everolimo 3 mg/kg quando dado junto com uma sub-dose de irinotecano 45 mg/kg foi capaz de aumentar a atividade dessa enzima presente em neutrófilos de maneira significativa, mais uma vez mostrando que há uma exacerbação do processo inflamatório quando da inibição do mTOR. Corroborando nosso achado esta o trabalhos de Küper e colaboradores (2016) que observaram que o everolimo aumentou a atividade enzimática da mieloperoxidase na cicatrização de feridas intestinais e que esse efeito negativo do everolimo foi abolido com o uso do hormônio do crescimento (KÜPER *et al.*, 2016). De maneira semelhante, em outro trabalho Küper e colaboradores (2011) demonstraram que o everolimo interfere com a fase inflamatória da cicatrização na anastomose experimental do cólon aumentando a atividade tecidual da mieloperoxidase (KÜPER *et al.*, 2011). De maneira contrária, a inibição do mTOR com rapamicina diminuiu a atividade da mieloperoxidase no trabalho de Yan e colaboradores (2015), onde observaram que a rapamicina atenuou a lesão

pulmonar aguda induzida por LPS através da inibição da proliferação de células Th17 em camundongos. Uma possível explicação para o resultado de MPO apresentado nesse modelo de lesão pulmonar aguda por LPS reside no fato de que ele simula uma condição seletiva apenas para ação de bactérias gram-negativas devido o uso do antígeno LPS o que de fato não ocorre na clínica, enquanto o que se observa após a administração do irinotecano é uma sepse polimicrobiana.

Em relação aos aspectos histopatológicos e morfométricos do íleo de animais submetidos a mucosite por irinotecano, os resultados aqui apresentados mostraram que a rapamicina no modelo experimental de 5 dias não alterou a lesão induzida pelo antineoplásico e o pré-tratamento com everolimo em animais submetidos à uma sub-dose de irinotecano intensificou as alterações morfométricas, corroborando com os achados histopatológicos. Dentre os achados histopatológicos vale a pena salientar as alterações celulares provocadas pelo pré-tratamento com rapamicina e everolimo observadas nas fotomicrografias revelando hipertrofia das células de Paneth nas amostras de intestino delgado de animais submetidos a mucosite intestinal. Um achado que até o momento não tinha sido evidenciado nesse modelo de toxicidade.

As células de Paneth são células especializadas do epitélio do intestino delgado e são uma importante fonte de peptídeos antimicrobianos, tais como  $\alpha$ -defensina e lisozimas, constituindo a defesa do hospedeiro e fazendo parte da homeostase intestinal através da regulação da composição da microbiota comensal (BEVINS & SALZMAN, 2011; SALZMAN *et al.*, 2010). No presente trabalho evidenciamos que estas células estavam hipertrofiadas de forma nunca antes vista neste modelo animal experimental, revelando uma acentuada presença de grânulos contendo substâncias antimicrobianas responsáveis por auxiliar na defesa intestinal do hospedeiro. A secreção destes grânulos ocorre em resposta a uma diversidade de estímulos como por exemplo o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (AYABE *et al.*, 2000). Wong e colaboradores (2015) já demonstraram que na mucosite intestinal pelo irinotecano há uma intensa bacteremia e translocação bacteriana. Sabe-se que os PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos), entre estes, o LPS, agonista de TLR-4, é capaz de ativar uma cascata de sinalização através de receptores *Toll-like* (MEDZHITOV, 2001). Neste trabalho, o aumento do nível de citocinas inflamatórias é possivelmente em decorrência da produção a partir de macrófagos e das células de Paneth que estão hipertrofiadas.

Hans Clevers (2012) mostrou que a restrição calórica e a rapamicina remodelam o intestino delgado induzindo a proliferação de células-tronco enquanto retardam a taxa de diferenciação de enterócitos e que esta alteração é mediada pelas células de Paneth (CLEVERS, 2012).

Na Doença de Crohn, uma marcante doença inflamatória intestinal que afeta o trato gastrointestinal com manifestações extraintestinais associada a desordens imunes, as células de Paneth e células caliciformes estão ativamente secretando o conteúdo dos seus grânulos caracterizando uma disfunção. Assim também ocorre na colite ulcerativa (BAUMGART & SANDBORN, 2012). Acredita-se que essa alteração hipertrófica e secretória das células de Paneth também possa estar ocorrendo na mucosite intestinal pelo irinotecano na vigência dos inibidores de mTOR, rapamicina e everolimo, como mostrados nos resultados deste trabalho.

Adicionalmente, Zhou e colaboradores (2015) mostraram a participação da sinalização via mTOR no controle da diferenciação das células de Paneth e células caliciformes no epitélio intestinal. Os autores evidenciaram que a ativação do mTOR é responsável pela diminuição das células de Paneth, tal efeito foi revertido com o tratamento com rapamicina (ZHOU *et al.*, 2015). Achado que corrobora com nossos resultados aqui apresentados. Desta forma, há uma sugestão que a hipertrofia das células de Paneth possivelmente contribui para exacerbação da lesão intestinal induzida pelo irinotecano juntamente com rapamicina e everolimo (inibidores de mTOR).

Van Vliet e colaboradores (2010) propõem a participação efetiva da microbiota intestinal comensal no desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias intestinais, tais como Doença de Crohn, estomatite (mucosite oral) e mucosite intestinal induzida pela radioterapia e quimioterapia. Os autores sugerem cinco pontos importantes do desenvolvimento da mucosite potencialmente influenciados pela microbiota intestinal comensal: 1) processo inflamatório e estresse oxidativo; 2) permeabilidade intestinal; 3) composição da camada mucosa; 4) resistência à estímulos nocivos e mecanismos de reparo epitelial e 5) ativação e liberação de moléculas efetoras imunes (VAN VLIET *et al.*, 2010). Nakao e colaboradores (2012) observaram uma alteração nas proteínas de junção após a administração de irinotecano, além disso os autores verificaram um aumento da resistência transepitelial no intestino delgado (NAKAO *et al.*, 2012). Estes achados foram corroborados por Gifoni (2012) que avaliou a permeabilidade intestinal em pacientes com câncer colorretal metastático atendidos no Hospital

Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer e que receberam regime quimioterápico a base de irinotecano. O trabalho do autor mostrou uma diminuição da excreção urinária de manitol e por conseguinte uma diminuição da relação lactulose-manitol (GIFONI, 2012). Adicionalmente, Wong e colaboradores (2015) indicaram bacteremia e aumento da translocação bacteriana para órgãos secundários, tais como fígado e linfonodos mesentéricos nos camundongos tratados com irinotecano (WONG *et al.*, 2015). No que se refere a disbiose intestinal induzida pelo irinotecano, Stringer e colaboradores (2008) evidenciaram um aumento de enterobactérias patogênicas, dentre elas a *Escherichia coli*, produtora de  $\beta$ -glicuronidase no intestino delgado exacerbando a lesão intestinal (STRINGER *et al.*, 2008). Dessa forma, vale ressaltar o papel relevante da microbiota intestinal comensal na patogênese da mucosite por irinotecano e que a sua modulação com probióticos é fundamental para o tratamento. Recentemente Ribeiro e colaboradores (2016) sugeriram que o bloqueio farmacológico do TLR-2 mostra-se potencial alvo terapêutico para atenuar a toxicidade da quimioterapia (RIBEIRO *et al.*, 2016).

A microbiota intestinal também é modulada pelo mTOR. Jung e colaboradores (2016) mostraram que a rapamicina e resveratrol, ambos inibidores do mTORC1, alteraram a microbiota intestinal e dessa forma conduziram para uma alteração metabólica e desenvolvimento de doenças como obesidade e diabetes do tipo II (JUNG *et al.*, 2016).

Alguns avanços foram obtidos com estudos que mostraram o envolvimento do mTOR no controle da resposta imune inata e adquirida (MONDINO & MUELLER, 2007). Já é conhecido que a atividade do mTOR está aumentada em diversos processos, tais como na ativação de receptores de antígeno (receptores de células T e B), receptores de citocinas (receptores da IL-2, entre outros) e dos receptores do tipo *Toll-like* (TLRs), um efeito que evidencia ser modulado pela ativação do PI3K (MONDINO & MUELLER, 2007). Nossos resultados mostraram que na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano há um aumento da expressão gênica do RNAm de PI3K.

A ativação do TLR-4 conduz a uma via de transdução de sinal *downstream* de intermediários de sinalização dependentes e independentes de uma proteína adaptadora, chamada MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) (AKIRA e TAKEDA, 2004). Dentre estes intermediários de sinalização do TLR-4 está o mTOR, uma proteína responsável por controlar o crescimento celular, proliferação e sobrevivência e que está amplamente expressa no organismo (LAPLANTE e SABATINI, 2009). O mTOR exerce seus efeitos

anabólicos estimulando a síntese protéica e a biogênese ribossomal, aumentando assim a proliferação celular e promovendo uma maior sobrevivência da célula através da detecção de sinais metabólicos, como por exemplo, ATP, oxigênio, aminoácidos, glicose e espécies reativas de oxigênio (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). A proteína adaptadora MyD88 desempenha um papel importante na compreensão da patogênese de efeitos colaterais relacionados à quimioterapia do câncer (FRANK *et al.*, 2015; SUKHOTNIK *et al.*, 2014; KACZMAREK *et al.*, 2012).

Wong e colaboradores (2015) evidenciaram a participação da proteína adaptadora MyD88 e dos receptores TLR-2 e TLR-9 na mucosite intestinal induzida por irinotecano. Foi observado que após a administração do irinotecano houve um aumento na expressão de MyD88 bem como dos parâmetros gerais avaliados, como dano tecidual, infiltração de neutrófilos e expressão de mediadores inflamatórios, além de aumentar a carga bacteriana no sangue e diminuir a sobrevivência dos animais selvagem (WT). Em contrapartida, camundongos *Knock-out* para MyD88 e TLR-2 apresentaram uma melhora significativa da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano pela atenuação desses parâmetros (WONG *et al.*, 2015). Assim, demonstrou-se que o MyD88, após ativação de receptores *Toll-like* (TLR-2 e TLR-9), exerce um papel prejudicial na patogênese da mucosite intestinal.

É importante destacar que o MyD88 contribui para a sinalização do mTOR, molécula em questão no presente trabalho. A sinalização via MyD88, ativa uma molécula chamada fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K) que dá continuidade a sinalização em direção ao mTOR. A PI3K é uma família de quinases de lipídios cuja principal função bioquímica é fosforilar o grupo 3-hidroxil dos fosfoinositídeos (CANTLEY, 2002). Já é bem estabelecida a participação da PI3K em processos inflamatórios envolvidos na oncologia (MARTIN *et al.*, 2011; SCHIMD *et al.*, 2011) e efeitos colaterais da quimioterapia, como por exemplo na cardiotoxicidade pelas antraciclina, tais como doxorrubicina, epirrubicina e daunorrubicina (GHIGO *et al.*, 2016). A inativação farmacológica ou genética do PI3K confere proteção em modelos murinos de doenças inflamatórias (GHIGO *et al.*, 2010).

Uma das manifestações mais proeminentes do tratamento quimioterápico e radioterápico do câncer é a diarreia, característica decorrente da mucosite intestinal (SONIS, 2004). A mucosite intestinal é um efeito adverso comum da quimioterapia sendo dose-limitante, estando associada com dor limitando a qualidade de vida, além de ser potencial risco para

septicemia (ALAMIR *et al.*, 2010). O mecanismo exato da diarreia decorrente da mucosite intestinal pelo irinotecano permanece incerto. Lima-Júnior e colaboradores (2014) observaram que a modulação farmacológica da IL-18 pela sua proteína ligante (IL18bp - Proteína ligante da IL-18) melhorou a lesão intestinal e principalmente a diarreia, evento chave na exacerbação da mucosite (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014). Nossos resultados, mostraram um aumento dos escores para diarreia quando da inibição do mTOR na mucosite intestinal. Dados da literatura comprovam que a inibição do mTOR, principalmente com everolimo causa uma marcante mucosite oral (estomatite), mas também uma mucosite intestinal que cursa com diarreia (BOERS-DOETS *et al.*, 2013; ABDEL-RAHMAN & FOUAD, 2015; PETERSON *et al.*, 2016;). Nesse caso há um efeito somatório da mucosite pelos inibidores de mTOR juntamente com o irinotecano.

Adicionalmente, Lima-Júnior e colaboradores (2014) demonstraram que não houve uma diferença na expressão gênica e protéica do IFN- $\gamma$  após a administração de irinotecano, corroborando nossos resultados. Por outro lado, nesse trabalho, a administração de rapamicina e everolimo aumentou significativamente a expressão gênica do RNAm desta citocina em animais submetidos à mucosite. Na mucosite intestinal induzida por irinotecano há um aumento de IL-18, conhecida anteriormente como fator indutor de IFN- $\gamma$ . No entanto, não há presença de IFN- $\gamma$  na mucosite intestinal por esse antineoplásico (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014). Fato este modificado após inibição do mTOR com rapamicina e everolimo. O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ativa a resposta imune inata aumentando o estímulo para citocinas inflamatórias e produção de quimiocinas, morte microbiana e apresentação de antígenos por fagócitos mononucleares, tais como os macrófagos (HU & IVASHKIV, 2009). Sabe-se que o IFN- $\gamma$  aumenta a produção de citocinas pelos macrófagos em resposta a um estímulo inflamatório como ligantes de receptores *Toll-like* atenuando a sinalização através do fator supressor de transcrição STAT3 (HU & IVASHKIV, 2009).

Curiosamente, com base em uma literatura recente vemos que os inibidores de topoisomerase I, no qual insere-se o irinotecano, bem como camptotecina e topotecano, exercem um efeito anti-inflamatório via TLR-4 (RIALDI *et al.*, 2016). Dessa forma fica evidente que há um balanço pró e anti-inflamatório na mucosite intestinal pelo irinotecano e sua modulação com inibidores de mTOR. Uma melhor compreensão da patofisiologia deste efeito colateral permite destrinchar com maior acuidade o que de fato acontece no organismo de indivíduos tratados com este quimioterápico.

No trabalho de Rialdi e colaboradores (2016) a administração de camptotecina e topotecano (inibidores de topoisomerase I) juntamente com o LPS (agonista de TLR-4) promoveu um efeito benéfico significativo em animais submetidos a modelo de choque séptico com aumento da sobrevivência desses animais em mais de 60% assim como a diminuição do nível de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dessa forma prevenindo a morte. Adicionalmente, dados ainda não-publicados do nosso grupo revelaram que o SN-38, metabólito ativo do irinotecano (inibidor de topoisomerase I) age como antagonista do TLR-4 e dessa forma compete pelo LPS (agonista clássico do TLR-4) pelo sítio ativo. É sabido que uma das formas de ativação do mTOR é através da sinalização via TLR-4 e que este receptor desempenha um papel anti-inflamatório muito importante, no entanto, os dados do presente trabalho evidenciam que o bloqueio farmacológico do mTOR com rapamicina e everolimo contribui para o agravamento da lesão e que portanto desempenha um papel pró-inflamatório.

Contrastando com esses resultados está o trabalho de Yan e colaboradores (2016) que demonstra que a inibição do mTOR com rapamicina conduz à uma melhora na lesão pulmonar aguda induzida por LPS através da inibição da proliferação de células Th17, processo este dependente da ativação do mTOR. Com isso evidencia-se a ambiguidade do papel do mTOR mostrando que ele pode desempenhar tanto um papel pró-inflamatório, como vemos no presente trabalho, tanto como anti-inflamatório (YAN, *et. al.*, 2016). Uma coisa é certa, o mTOR desempenha um papel central na homeostase celular.

De forma curiosa, o trabalho de Bracho-Valdéz e colaboradores (2011) revela que dependendo da dose do inibidor de mTOR existe um bloqueio diferencial dos complexos de mTOR, podendo ser seletivo para mTORC1 ou mTORC2 ou ainda parcial para os dois (BRACHO-VALDÉZ *et al.*, 2011). Neste trabalho utilizamos a rapamicina que é um inibidor específico do mTORC1, entretanto, o everolimo dependendo da dose pode apresentar uma atividade para o mTORC2. Acreditamos que a dose escolhida para o everolimo (3 mg/kg) seja suficiente para bloquear apenas o complexo mTORC1. Portanto, ainda há muito o que se avaliar no tocante à esta proteína (mTOR) no contexto da mucosite, haja vista não ter sido descrita a participação do mTORC2 neste efeito colateral na literatura.

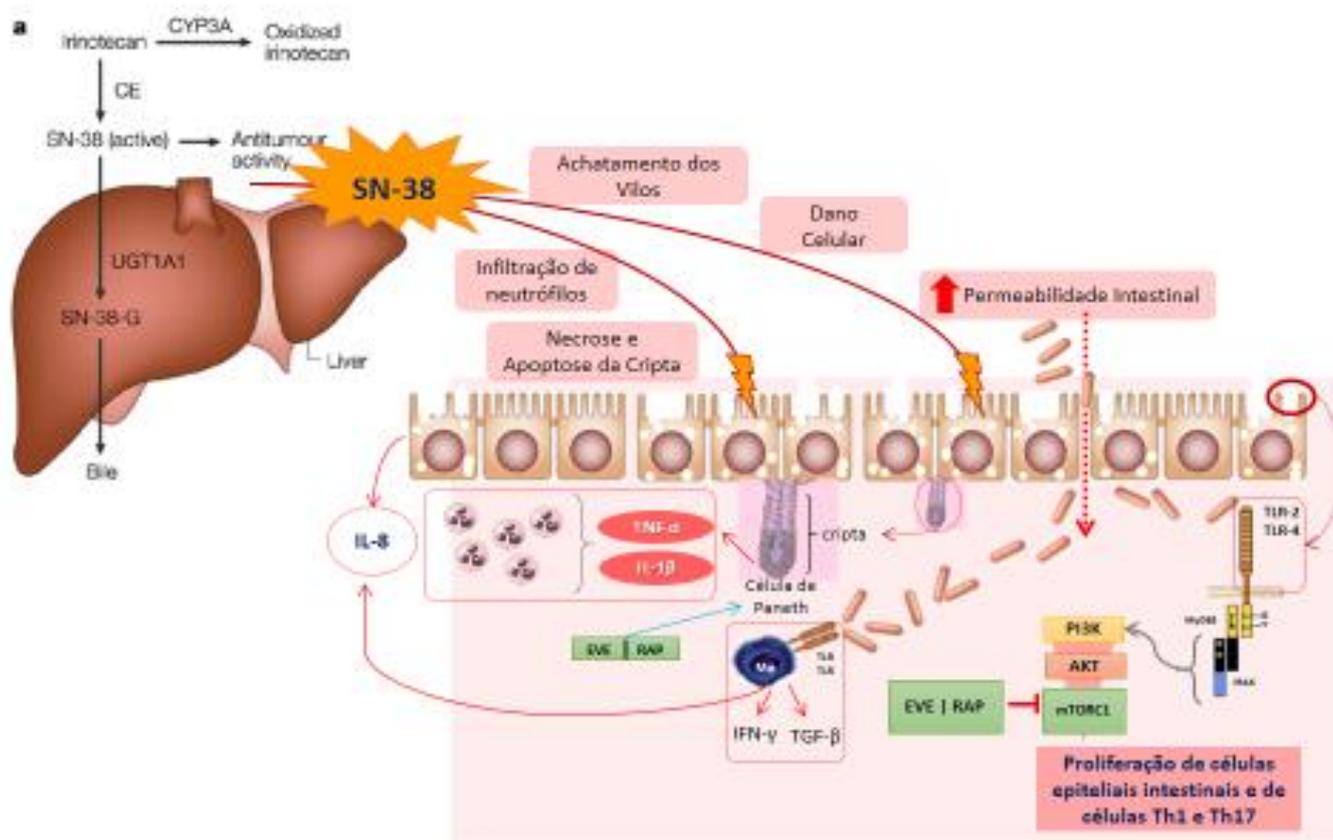
Lima-Júnior e colaboradores (2014) também demonstraram o envolvimento da via caspase-1/IL-18 na mucosite intestinal e que a inibição específica da interleucina 18 com a

proteína ligante para esta citocina (IL-18bp) melhorou significativamente os parâmetros relacionados a disfunção intestinal, bem como melhorou a sobrevida e reduziu o dano tecidual e inflamatório observado pela infiltração de neutrófilo (MPO) e imunomarcação para iNOS. A IL-18 parece ter um papel relevante no contexto Th1, juntamente com a IL-12 ou IL-15, devido a capacidade de induzir IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  é fundamental na regulação da resposta imune adaptativa Th1. No entanto, no trabalho de Lima-Júnior e colaboradores (2014) o IFN- $\gamma$  não foi expresso de maneira significativa e uma das explicações para tal fato é que na ausência de citocinas como IL-12 ou IL-15, a IL-18 não tem capacidade de induzir o IFN- $\gamma$  e dessa forma desempenha uma resposta imune Th2 (DINARELLO *et. al.*, 2013). Outra explicação para a baixa produção de IFN- $\gamma$  nesse modelo é que foi avaliado no quinto dia, sendo então precoce sugerindo a participação mais efetiva do sistema imune inato e não do sistema imune adaptativo o qual acredita-se ainda estar em transição neste modelo experimental de mucosite intestinal induzido pelo irinotecano. Em outros modelos inflamatórios em animais como por exemplo da colite induzida por DSS, o bloqueio do mTOR com rapamicina ou everolimo é muito eficaz e suprime a produção de IFN- $\gamma$  dessa forma induzindo um efeito terapêutico (FARKAS *et. al.*, 2006; MATSUDA *et. al.*, 2007).

O TGF- $\beta$  é reconhecidamente uma citocina anti-inflamatória. Entretanto, quando na presença de IL-1 $\beta$  e IL-6 o TGF- $\beta$  apresenta um perfil pró-inflamatório conduzindo para a polarização de linfócitos Th17 (ROMAN-BLAS *et al*, 2006; SANJABI *et al*, 2009; HAN *et al.*, 2012). Após inibição do mTOR com rapamicina e everolimo houve um aumento significativo no nível desta citocina no íleo de camundongos submetidos a mucosite intestinal. Num processo mais crônico, onde há participação de imunidade adaptativa, acreditamos que o TGF- $\beta$ , polarizando para linfócitos Th17 juntamente com IFN- $\gamma$ , polarizando para linfócitos Th1 possam ser co-participadores responsáveis por um perfil pró-inflamatório e conseqüentemente pelo agravamento da lesão inflamatória intestinal. No entanto, nosso modelo é agudo e envolve majoritariamente a imunidade inata, onde nesse caso as células de Paneth é que seriam responsáveis por intensificar esse processo inflamatório. Há ainda outro agravante que é o efeito direto da inibição do mTOR sob a proliferação de células epiteliais intestinais que por si já é um fator determinante para o estabelecimento dessa lesão, uma vez que a ativação do mTOR é fundamental para proporcionar o *turnover* das células epiteliais intestinais.

Apesar do avanço na compreensão da função do mTOR, esta proteína de ação pleiotrópica, ainda faz-se necessário mais estudos no intuito de investigar sua participação nos mecanismos fisiopatológicos subjacentes da mucosite intestinal induzida por irinotecano e outros quimioterápicos. Além disso, é importante ter um maior cuidado em protocolos clínicos que envolvam o uso de inibidores de mTOR, tais como o everolimo, em combinação com outras drogas, como por exemplo o irinotecano, no sentido de minimizar ou anular os efeitos colaterais e potencializar o efeito terapêutico desejado, avaliando sempre a melhor dose e aprazamento no sentido de evitar um agravamento dos efeitos colaterais decorrente da quimioterapia.

**FIGURA 29. Modelo hipotético da modulação farmacológica da inibição do mTOR na mucosite intestinal induzida por irinotecano.**



O irinotecano é um pró-fármaco metabolizado no fígado por ação da enzima CE-hep (carboxilesterase hepática) dando origem ao seu metabólito ativo SN-38 que detem um efeito antitumoral 1000x maior que o próprio irinotecano. O SN-38 uma vez no intestino delgado pode lesar o epitélio intestinal através de dano celular direto proporcionado pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, não representado na figura) causando achatamento e encurtamento dos vilos, necrose e apoptose das células da cripta, dessa forma destruindo e alterando a estrutura anatômica do intestino. Esse processo lesivo é acompanhado da presença de mediadores inflamatórios gerados pelo próprio epitélio intestinal danificado como por células residentes. Esse é o caso da quimiocina IL-8 (KC no camundongo), fator quimiotático para neutrófilos. Estas células por sua vez ativarão a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para modulação do processo inflamatório instaurado. Na mucosite intestinal também ocorre um aumento da permeabilidade intestinal muito em decorrência da destruição de proteínas juncionais entre as células epiteliais e desta forma permitem a translocação bacteriana de sítios periféricos como o linfonodo mesentérico, por exemplo. A presença das bactérias por sua vez, ativam receptores Toll-like presentes tanto na superfície das células epiteliais intestinais como na superfície de células residentes (macrófagos). A ativação de TLRs conduz a uma sinalização via proteína adaptadora MyD88 culminando na ativação do eixo PI3/Akt/mTOR. O mTORC1 (complexo mTOR 1) ativado é responsável por aumentar a proliferação de células epiteliais intestinais, o que não acontece com a utilização de rapamicina ou everolimo, uma vez que bloqueiam. Além disso, quando da inibição do mTORC1, na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, com rapamicina ou everolimo, há uma hipertrofia das Células de Paneth, que compõem o sistema imune inato e que também desempenham papel importante na produção de citocinas inflamatórias além de retardar a diferenciação de enterócitos. Acreditamos que os macrófagos ativados sejam responsáveis pela produção de IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  por um mecanismo ainda incerto. Esquema elaborado por Lucas L. Carvalho e Daniel C. Gurgel, 2016.

---

## **CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS**

---

## 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Diante dos dados apresentados neste trabalho, foi possível concluir que:

- ✓ O irinotecano 75 mg/kg aumenta a expressão do RNAm das proteínas PI3K, Akt e mTOR, bem como o nível tecidual das citocinas KC e IL-1 $\beta$ , mas não aumenta o nível de TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ .
- ✓ O bloqueio farmacológico do mTOR com rapamicina numa dose de irinotecano 75 mg/kg no modelo de 5 dias evidenciou um aumento na perda ponderal e hipertrofia das células de Paneth de forma discreta, bem como intensificou a leucopenia. O Everolimo quando dado aos animais numa sub-dose de irinotecano 45 mg/kg no modelo de 7 dias mostrou agravar a lesão intestinal evidenciado pelo aumento da perda ponderal, um tendência no aumento dos escores de diarreia acompanhado de intensificação do desarranjo estrutural do íleo evidente na análise microscópica e escores histopatológicos. O everolimo na dose padrão de irinotecano 75 mg/kg evidenciou um achado muito interessante e até agora inédito neste modelo de mucosite intestinal que foi a hipertrofia das células de Paneth de forma muito clara.
- ✓ A inibição do mTOR com rapamicina e everolimo exacerbou o processo inflamatório evidenciado pelo aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) quando o everolimo foi administrado numa sub-dose de irinotecano 45 mg/kg e pelo aumento do nível tecidual de TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  quando da administração junto com irinotecano 75 mg/kg.

De maneira a complementar a hipótese e enriquecer este trabalho tem-se como perspectivas realizar dosagem tecidual do nível de citocinas como IL-6 (para comprovar o envolvimento pró-inflamatório do TGF- $\beta$ ), além da IL-12. E adicionalmente realizar citometria de fluxo para identificar o perfil celular predominante nesta toxicidade do irinotecano modulado com inibidores de mTOR.

---

## REFERÊNCIAS

---

## 7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, O.; FOUAD, M. Risk of oral and gastrointestinal mucosal injury in patients with solid tumors treated with everolimus, temsirolimus or ridaforolimus: a comparative systematic review and meta-analysis. **Expert Rev Anticancer Ther.** 15(7): 847-858. 2015.
- ABRAHAM, R.T; WIEDERRECHT, G.J. Immunopharmacology of Rapamycin. **Annu Rev Immunol.** 14:483-510. 1996
- AKIRA, S; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.** 4: 499–511. 2004.
- ALAMIR, I; BOUKHETTALA, N; AZIZ, M; BREUILLÉ, D; DÉCHELOTTE, P; COËFFIER, M. Beneficial effects of cathepsin inhibition to prevent chemotherapy-induced intestinal mucositis. **Clinical Experimental Immunology.** 162: 298-305. 2010.
- ALVES-FILHO, J.C; 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.
- ANDRÉ, T.; LOUVERT, C.; MAINDRAULT-GOEBEL, F.; COUTEAU, C.; MABRO, M.; LOTZ, J.P; GILLES-AMAR, V.; KRULIK, M.; CAROLA, E.; IZRAEL, V.; de GRAMONT on behalf of GERCOR. CPT-11 (Irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-Fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. **European Journal of Cancer.** 35(9): 1343-1347. 1999.
- ARIFA, R.D.N.; MADEIRA, M.L.F.; de PAULA, T.L.; LIMA.R, L.; TAVARES, L.D.; MENEZES-GARCIA, Z.; FAGUNDES, C.T.; RACHID, M.A.; RYFFEL, B.; ZAMBONI, D.S.; TEIXEIRA, M.M.; SOUZA, D.G. Inflammasome Activation Is Reactive Oxygen Species Dependent and Mediates Irinotecan-Induced Mucositis through IL-1band IL-18 in Mice. **The American Journal of Pathology.** 184(7): 2023-2034. 2014.
- AYABE, T. *et al.* Secretion of microbicidal  $\alpha$ -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nature Immunol.** 1, 113–118. 2000.
- BAUMGART, D.C; SANDBORN, W.J. Crohn’s disease. **The Lancet.** 380:1590-1605. 2012.
- BERG, A.K; BUCKNER, J.C; GALANIS, E; JAECKLE, K.A; AMES, M.M; REID, J.M. Quantification of the impact of enzyme-inducing antiepileptic drugs on irinotecan pharmacokinetics and SN-38 exposure. **The Journal of Clinical Pharmacology.** 55(11) 1303-1312. 2015.
- BEVINS, C.L; SALZMAN, N.H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. **Nature Review.** 9: 356-368. 2011.
- BLIJLEVENS, N.M. Cytotoxic treatment-induced gastrointestinal symptoms. **Curr Opin Support Palliat Care.** 16-22. 2015.

- BOSSI, P.; LUCCHESI, M.; ANTONUZZO, A. Gastrointestinal toxicities from targeted therapies: measurement, duration and impact. **Curr Opin Support Palliat Care.** 9: 163-167. 2015.
- BOERS-DOETS, C.B; RABER-DURLACHER, J.E.; TREISTER, N.S; EPSTEIN, J.B.; ARENDS, A.B.P.; WIERSMA, D.R.; LALLA, R.V.; LOGAN, R.M.; VAN ERP, N.P.; GELDERBLOM, H. Mammalian target of rapamycin inhibitor-associated stomatitis. **Future Oncology.** 9(12): 1883-1892. 2013.
- BRACHO-VALDÉS, I; MORENO-ALVAREZ, P; VALENCIA-MARTÍNEZ, I; ROBLES-MOLINA, E; CHÁVEZ-VARGAS, L; VÁZQUEZ-PRADO, J. mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. **Life.** 63(10): 896-914. 2011.
- BRADSHAW-PIERCE, E.L.; PITTS, T.M.; KULIKOWSKI, G.; SELBY, H.; MERZ, A.L.; GUSTAFSON, D.L.; SERKOVA N.J.; ECKHARDT, S.G.; WEEKES, C.D. Utilization of quantitative in vivo pharmacology approaches to assess combination effects of everolimus and irinotecan in mouse xenograft models of colorectal cancer. **Plos One.** 8(3). 2013.
- CABRERA, L.C; MARTÍ, T.; CATALÁ, V.; TORRES, F.; MATEU, S.; BALLARÍN, C.J; *et al.* Effects of rapamycin on angiomyolipomas in patients with tuberous sclerosis. **Nefrologia** 31:292-8. 2011.
- CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science.** 296: 1655-1670. 2002.
- CASANOVA, A.; MARÍA, G.R.; ACOSTA, O.; BARRÓN, M.; VALENZUELA, C.; ANCOCHEA, J. Lymphangioliomyomatosis treatment with sirolimus. **Arch Bronconeumol** 47:470-2. 2011.
- CASSIDY, J.; CLARKE, S.; DIAZ-RUBIO, E.; SCHEITHAUER, W; FIGER, A.; WONG, R.; KOSKI, S.; LICHINITSER, M.; YANG, T.S.; RIVERA, F.; COUTURE, F.; SIRZÉN, F.; SALTZ, L. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology.** 26(12): 2006-2012. 2008.
- 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. The Paneth cell, caloric restriction and intestinal integrity. **The New England Journal of Medicine.** 367:1560-1561, 2012
- CUNHA, F.Q; BOUKILI, M.A; MOTTA, J.I.B; VARGAFTIG, B.B; FERREIRA, S.H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 238:47-52, 1993.
- DEANE, J. A. AND FRUMAN, D. A., Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. **Annu. Rev. Immunol.** 22: 563-598, 2004.

DeGRAMONT, A.; FIGER, A.; SEYMOUR, M.; HOMERIN, M.; HMISSI, A.; CASSIDY, J.; BONI, C.; CORTES-FUNES, H.; CERVANTES, A.; FREYER, G.; PAPAMICHAEL, D.; Le BAIL, N.; LOUVET, C.; HENDLER, D.; de BRAUD, F.; WILSON, C.; MORVAN, F.; BONETTI, A. Leucovorin and Fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**. 18(16): 2938-2947. 2000.

DeKLOTZ, C.M.; OGRAM, A.E.; SINGH, S.; DRONAVALLI, S.; MacGREGOR, J.L. Dramatic improvement of facial angiofibromas in tuberous sclerosis with topical rapamycin: Optimizing a treatment protocol. **Arch Dermatol** 2011;147:1116-7.

DELGOFFE, G.M; POWELL, J.D. mTOR: taking cues from the immune microenvironment. **Immunology** 127: 459–465, 2009.

DENLINGER, C.S; ENGSTROM, P.F. Colorectal cancer survivorship: movement matters. **Cancer Prev Res (Phila)**. 4(4): 502–511. 2011.

DE OLIVEIRA, M. A.; MARTINS, E. M. F.; WANG, Q.; SONIS, S.; DEMETRI, G.; GEORGE, S. Clinical presentation and management of mTOR inhibitor-associated stomatitis. **Oral Oncol**. 47:998–1003. 2011.

DINARELLO, C.A; NOVICK, D; KIM, S; KAPLANSKI, G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. **Front Immunol**. 4:1–10. 2013.

DOUILLARD, J.Y.; CUNNINGHAM, D.; ROTH, A.D; NAVARRO, M.; JAMES, R.D.; KARASEK, P.; JANDIK, P.; IVESON, T.; CARMICHAEL, J.; ALAKL, M.; GRUIA, G.; AWARD, L.; ROUGIER, P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: multicentre randomized trial. **Lancet**. 355: 1041-1047. 2000.

DOUILLARD, J.Y.; SIENA, S.; CASSIDY, J.; TABERNERO, J.; BURKES, R.; BARUGEL, M.; HUMBLET, Y.; BODOKY, G.; CUNNINGHAM, D.; JASSEM, J.; RIVERA, F.; KOCÁKOVA, I.; RUFF, P.; BŁASINSKA-MORAWIEC, M.; MAKAL, M.S.; CANON, J.L; ROTHER, M.; OLINER, K.S.; WOLF, M; GANSERT, J. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The PRIME Study. **Journal of Clinical Oncology**. 28. 2010.

ELTING, L.S; COOKSLEY, C; CHAMBERS, M; CANTOR, S.B; MANZULLO, E; RUBENSTEIN, E.B. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer**. 98:1531-1539. 2003.

ELTING, L.S; COOKSLEY, C.D; CHAMBERS, M.S; GARDEN, A.S; Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 68:1110-1120. 2007.

ENZINGER, P.C; KULKE, M.H.; CLARK, J.W.; RYAN, D.P.; KIM, H; EARLE, C.C; VINCITORE, M.M; MICHELINI, A.L; MAYER, R.J; FUCHS, C.S. A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig Dis Sci**. 50(12): 2218-23. 2006.

FARKAS, S; HORNUNG, M; SATTLER, C; GUBA, M; STEINBAUER, M; ANTHUBER, M; HERFARTH, H; SCHILLT, H.J; GEISSLER, E.K. Rapamycin decreases leukocyte migration in vivo and effectively reduces experimentally induced chronic colitis. **Int J Colorectal Dis.** 21:747-753. 2006.

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.

FRANCESCHI S., WILD C.P. Meeting the global demands of epidemiologic transition - the indispensable role of cancer prevention. **Mol.Oncol**; 7(1):1-13. 2013.

FRANK, M; HENNENBERG, E.M; EYKING, A; RÜNZI, M; GERKEN, G; SCOTT, P. TLR signaling modulates side effects of anticancer therapy in the small intestine. **J Immunol.** 194(4): 1983–95. 2015.

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].

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.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity.** 39(6): 1003-1018. 2013.

GIACCHETTI, S.; PERPOINT, B.; ZIDANI, R.; Le BAIL, N.; FAGGIUOLO, R.; FOCAN, P.; CHOLLET, P.; LLORY, J.F.; LETOURNEAU, COUDERT, B.; BERTHEAUT-CVITKOVIC, F.; LARREGAIN-FOURNIER, D.; Le ROL, A.; WALTER, S.; ADAM, R.; MISSET, J.L.; LÉVI, F. Phase II multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated Fluorouracil-Leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology.** 18(1): 136-147. 2000.

GIANTONIO, B.J.; CATALANO, P.J.; MEROPOL, N.J.; O'DWYER, P.; MITCHELL, E.P.; ALBERTS, S.R.; SCHWARTZ, M.; BENSON III, A.B. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. **Journal of Clinical Oncology.** 25(12): 1539-1544. 2007.

GIBSON, R.J; BOWEN, J.M; INGLIS, M.R; CUMMINS, A.G; KEEFE, D.M. Irinotecan causes severe small intestine damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J Gastroenterol Hepatol.** 18(9): 1095-1100. 2003.

GIBSON, R.J; BOWEN, J.M; ALVAREZ, E; FINNIE, J; KEEFE, D.M. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. **Cancer Chemotherapy.** 53(5):360-369. 2007.

GIFONI, M.A.D. **Mucosite e alterações de permeabilidade intestinal em pacientes portadores de câncer colorretal metastáticos tratados com com 5-Fluorouracil (5-FU) e irinotecano (CPT-11).** Fortaleza; 2012. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará].

GHIGO, A; LI, M; HIRSCH, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1916-1925. 2016.

GHIGO, A; DAMILANO, F; BRACCINI, L. HIRSCH, E. PI3K inhibition in inflammation: toward tailored therapies for specific diseases. **Bioessays**. 32: 185–196. 2010.

GUERTIN, D.A; SABATINI, D.M. Defining the role of mTOR in Cancer. **Cancer Cell**. 12: 9-22. 2007.

GUABIRABA, R.; BESNARD, A.G.; MENEZES, G.B.; SECHER, T.; JABIR, M.S.; AMARAL, S.S. IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunol**. 7:1079–1093. 2014.

HAN, G.; LI, F.; SINGH, T.P.; WOLF, P.; WANG, X.J. The proinflammatory role of TGF- $\beta$ 1: a paradox? **International Journal of Biological Science**. 8(2): 228-235. 2012.

HAY, N; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes Dev**. 18:1926 – 1945. 2004.

HU, X; IVASHKIV, L.B. Cross-regulation of signaling pathways by interferon- $\gamma$ : implications for immune responses and autoimmune diseases. **Immunity**. 31: 539–550. 2009.

HUANG, J; MANNING, B.D. The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. **Biochem J**. 412(2):179–90. 2008.

HURWITZ, H.; FEHRENBACHER, L.; NOVOTNY, W.; CARTWRIGHT, T.; HAINSWORTH, J.; HEIM, W.; BERLIN, J.; BARON, A.; GRIFFING, S.; HOLMGREN, E.; FERRARA, N.; FYFE, G.; ROGERS, B.; ROSS, R.; KABBINAVAR, F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine**. 350(23): 2335-2342. 2004.

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**. 87:1876-1888. 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em: 10/08/2016.

JONES, J.A; AVRITSCHER, E.B; COOKSLEY, C.D; MICHELET, M; BEKELE, B.N.; ELTING, L.S. Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. **Support Care Cancer**. 14:505-515. 2006.

JUNG, M.J; LEE, J; SHIN, N.R; KIM, M.S; HYUN, D.W; YUN, J.H; KIM, P.S; WHON, T.W; BAE, J.W. Chronic repression of mTOR complex 2 induces changes in the gut microbiota of diet-induced obese mice. **Nature Scientific Reports**. 6: 1-10. 2016.

- KACZMAREK, A; BRINKMAN, B.M; HEYNDRIKX, L; VANDENABEELE, P; KRYSKO, D.V. Severity of doxorubicin-induced small intestinal mucositis is regulated by the TLR-2 and TLR-9 pathways. **J Pathol.** 226. 2012.
- KATSO, R; OKKENHAUG, K; AHMADI, K; WHITE, S; TIMMS, J. AND WATERFIELD, M. D., Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 17: 615–675, 2001.
- 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 research.** (51) 4187-4191. 1991.
- KEEFE, D.M; BREALEY, J; GOLAND, G.J; CUMMINS, A.G; Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut.** 47:632-637. 2000.
- KEEFE, D.M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Curr Opin Oncol.** 19:323-327. 2007
- KLAWITTER, J.; BJÖRN, N.; CHRISTIANS, U. Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different. **Expert Opinion on Drug Safety.** 14(7). 2015.
- KOENIG, M.K.; BUTLER, I.J.; NORTHRUP, H. Regression of subependymal giant cell astrocytoma with rapamycin in tuberous sclerosis complex. **J Child Neurol.** 23:1238-1249. 2008.
- KOHRMAN, M.H. Emerging treatments in the managements of tuberous sclerosis complex. **Pediatr Neurol.** 46(5):267–275. 2012.
- 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):211-220. 2000.
- KÜPER, M.A.; SCHÖLZL, N.; TRAUB, F.; MAYER, P.; WEINREICH, J.; COERPER, S.; STEURER, W.; KÖNIGSRÄINER, A.; BECKERT, S. Everolimus interferes with the inflammatory phase of healing in experimental colonic anastomoses. **J Surg Res.** 167(1):158-165. 2011.
- KÜPER, M.A; TRÜTSCHL, S.; WEINREICH, J.; KÖNIGSRÄINER, A.; BECKERT, S. Growth hormone abolishes the negative effects of everolimus on intestinal wound healing. **World J Gastroenterol.** 22(17): 4321-4329. 2016.
- LALLA, R.V; BOWEN, J; BARASCH, A; ELTING, L; EPSTEIN, J; KEEFE, D.M; McGUIRE, D.B; MIGLIORATI, C; NICOLATOU-GALITIS, O; PETERSON, D.E; RABER-DURLACHER, J.E; SONIS, S.T; ELAD, S. MASCC/ISOO Clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer.** 1453-1461. 2014.
- LANGER, C.J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. **Oncology.** 18(7): 17-28. 2004.

LAPLANTE, M; SABATINI, D.M. mTOR signaling at a glance. **J. Cell Sci.** 122: 3589–3594. 2009.

LEE, L.; SENG, K.Y.; WANG, L.Z.; YONG, W.P.; HEE, K.H.; SOH, T.I; WONG, A.; CHEONG, P.F.; SOONG, R.; SAPARI, N.S.; SOO, R.; FAN, L.; LEE, S.C.; GOH, B.C. Phenotyping of UGT1A1 activity using raltegravir predicts pharmacokinetics and toxicity of irinotecan in FOLFIRI. **Plos one.** 11(1):1-15. 2016.

LIMA-JUNIOR, R.C; FIGUEIREDO, A.A; FREITAS, H.C, *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.

LIMA-JÚNIOR, R.C.P; FREITAS, H.C; WONG, D.V.T *et al.* Targeted inhibition of interleukin-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Pharmacol** 171(9): 2335-50. 2014.

LOGAN, R.M; STRINGER, A.M; BOWEN, J.M; GIBSON, R.J; SONIS, S.T; KEEFE, D.M. Serum levels of NFκB and drug pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol Ther**, 7(7): 1139-45. 2008a.

LOGAN, R.M; GIBSON, R.J; BOWEN, J.M; STRINGER, A.M; SONIS, S.T; KEEFE, D.M. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucosite. **Cancer Chemother Pharmacol.** 62(1):33-41, 2008b.

LORNE, E; ZHAO, X; ZMIJEWSKI, J.W; LIU, G; PARK, Y.J; TSURUTA, Y; ABRAHAM, E. Participation of mammalian target of rapamycin complex 1 in Toll-Like receptor 2- and 4-induced neutrophil activation and acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Bio.** 41:237-245. 2009.

MCCORMACK, F.X.; INOUE, Y.; MOSS, J.; SINGER, L.G.; STRANGE, C.; NAKATA, K.; *et al.* National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioleiomyomatosis. **N Engl J Med.** 364:1595-606. 2011.

MACPHERSON, B.R., PFEIFFER, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion.** 17(2):135–50. 1978.

MARTIN, D. PI3Kγ mediates Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vGPCR-induced sarcomagenesis. **Cancer Cell.** 19: 805–813. 2011.

MARTINS, F.; DE OLIVEIRA, M. A.; WANG, Q.; SONIS, S; GALLOTTINI, M.; GEORGE, S. A review of oral toxicity associated with mTOR inhibitor therapy in cancer patients. **Oral Oncol.** 49:293–298. 2013.

MATSUDA, C; ITO, T; SONG, J; MIZUSHIMA, T; TAMAGAWA, H; KAI, Y; HAMANAKA, Y; INOUE, M; NISHIDA, T; MATSUDA, H; SAWA, Y. Therapeutic effect of a new immunosuppressive agent, everolimus, on interleukin-10 gene-deficient mice with colitis. **Clinical and Experimental Immunology.** 138:348-359. 2007.

MAJOR, P. Potential of mTOR inhibitors for the treatment of subependymal giant cell astrocytomas in tuberous sclerosis complex. **Aging** (Albany NY) 3:189-91. 2011.

MEDZHITOV, R. Toll-Like Receptors and Innate Immunity. **Nature Reviews Immunology**. 1: 135-145. 2001.

MELO, M.L.; BRITO, G.A.; SOARES, R.C.; CARVALHO, S.B.; SILVA, J.V.; SOARES, P.M.; VALE, M.L.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. 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.

MONDINO, A; MUELLER, D.L. mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance. **Semin Immunol**. 19(3):162-172. 2007.

MUSHABEN, E.M; BRANDT, E.B; HERSHEY, G.K.K; Le CRAS, T. Differential effects of rapamycin and dexamethasone in mouse models of established allergic asthma. **Plos one**. 8(1): 1-16. 2013.

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):341-347. 2012.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2016. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/>>. Acesso em: 21/07/2016.

NOVARTIS PHARMACEUTICALS CORPORATION. 2014. Afinitor (everolimus tablets for oral administration). Afinitor Disperz (everolimus tablets for oral suspension) [package insert.]. Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ.

OHTANI, M; NAGAI, S; KONDO, S; MIZUNO, S; NAKAMURA, K, *et al.* Mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase 3 differentially regulate lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production in dendritic cells. **Blood**. 112: 635–643, 2008.

ORMEROD, A.D.; SHAH, S.A.; COPELAND, P.; OMAR, G.; WINFIELD, A. Treatment of psoriasis with topical sirolimus: Preclinical development and a randomized, double-blind trial. **Br J Dermatol**. 152:758-64. 2005.

PATHAK, S. K; BASU, S; BASU, K. K; BANERJEE, A; PATHAK, S; BHATTACHARYYA, A; KAISHO, T. *et al.*, Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nat Immunol**. 8:610–618. 2007.

PENCREACH, E.; GUÉRIN, E.; NICOLET, C.; LELONG-REBEL, I.; VOEGELI, A.C.; OUDET, P.; LARSEN, A.K.; GAUB, M.P.; GUENOT, D. Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. **Clin Cancer Res**. 15(4): 1297-1307. 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.

PETERSON, D.E; O'SHAUGHNESSY, J.A.; RUGO, H.S.; ELAD, S.; SCHUBERT, M.M.; VIET, C.T.; CAMPBELL-BAIRD, C.; HRONEK, J.; SEERY, V.; DIVERS, J.; GLASPY, J.; SCHMIDT, B.L.; MEILLER, T.F. Oral mucosal injury caused by mammalian target of rapamycin inhibitors: emerging perspectives on pathobiology and impact on clinical practice. **Cancer Medicine.** 5(8): 1897-1907. 2016.

PETROULAKIS, E; MAMANE, Y; Le BACQUER, O; SHAHBAZIAN, D; SONENBERG, N. mTOR signaling: implications for cancer and anticancer therapy. **British Journal of Cancer.** 94: 195-199. 2006.

PICO, J.L; AVILA-GAVARITO, A; NACCACHE, P. Mucositis: its occurrence, consequences and treatment in the oncology setting. **The oncologist.** 3:446-451. 1998.

RIALDI, A.; CAMPISI, L.; ZHAO, N.; LAGDA, A.C; PIETZCH, C.; SOOK, J.; HO, Y.; MARTINEZ-GIL, L.; FENOUIL, R.; CHEN, X.; EDWARDS, M.; METREVELI, G.; JORDAN, S.; PERALTA, Z.; MUNOZ-FONTELA, C.; BOUVIER, N.; MERAD, M.; JIN, J.; WEIRAUCH, M.; HEINZ, S.; BENNER, C.; VAN BAKEL, H.; BASLER, C.; GARCIA-SASTRE, A.; BUKREYEV, A.; MARAZZI, I. Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. **Science.** 1-23. 2016.

RIAZ, H.; RIAZ, T.; HUSSAIN, S.A. mTOR inhibitors: A novel class of anticancer agents. **Infect Agent Cancer.** 7(1). 2012.

RIBEIRO, R.A; WANDERLEY, C.W.S; WONG, D.V.T; MOTA, J.M.S.C; LEITE, C.A.V.G; SOUZA, M.H.L.P; CUNHA, F.Q; LIMA-JÚNIOR, R.C.P. Irinotecan- and 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer chemother pharmacol.** 1-13. 2016.

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.

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 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.

ROMAN-BLAS, J.A.; STOKES, D.G.; JIMENEZ, S.A. Modulation of TGF- $\beta$  signaling by proinflammatory cytokines in articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**. 15: 1367-1377. 2007.

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

SAFIEH-GARABEDIAN, B; POOLE, S; ALLCHORNE, A; WINTER, J; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**. 115:1265–1275. 1995.

SAGGAR, S.; ZEICHNER, J.A.; BROWN, T.T.; PHELPS, R.G.; COHEN, S.R. Kaposi's sarcoma resolves after sirolimus therapy in a patient with pemphigus vulgaris. **Arch Dermatol**. 144:654-667. 2008.

SALZMAN, N. *et al.* Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. **Nature Immunol**. 11: 76–82. 2010.

SANJABI, S.; ZENEWICZ, L.A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R.A. Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. **Curr Opin Pharmacol**. 9(4): 447-453. 2009.

SANKHALA, K.; MITA, A.; KELLY, K.; MAHALINGAM, D.; GILES, F.; MITA, M. The emerging safety profile of mTOR inhibitors, a novel class of anticancer agents. **Target Oncol**. 4:135–142. 2009.

SCARTOZZI, M.; VINCENT, L.; CHIRON, M.; CASCINU, S. Aflibercept, a new way to target angiogenesis in the second line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). **Targ Oncol**. 1-12. 2016.

SCHAEFER, L. Complexity of Danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. **J. Biol. Chem**. 2014.

SCHMID, M.C. *et al.* Receptor tyrosine kinases and TLR/IL1Rs unexpectedly activate myeloid cell PI3K $\gamma$ , a single convergent point promoting tumor inflammation and progression. **Cancer Cell**. 19: 715–727. 2011.

SCHMITZ, F; HEIT, A; DREHER, S; EISENACHER, K; MAGES, J. *et al.* Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. **Eur J Immunol**. 38: 2981–2992. 2008.

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

SETO, BELINDA. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. **Clinical and translational medicine**. 1:29. 2012.

SOBRERO, A.F.; MAUREL, J.; FEHRENBACHER, L.; SCHEITHAUER, W.; ABUBAKR, Y.A.; LUTZ, M.P.; VEGA-VILLEGAS, E.; ENG, C.; STEINHAEUER, E.U.; PRAUSOVA, J.;

LENZ, H.J.; BORG, C.; MIDDLETON, G.; KRÖNING, H.; LUPPI, G.; KISKER, O.; ZUBEL, A.; LANGER, C.; KOPIT, J.; BURRIS III, H.A. EPIC: Phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**. 26(14): 2311-2319. 2008.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**. 4(4):277-284. 2004.

SONIS, S.T; FEY, E.G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**. 2002.

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

SORIA, A.; AGBO-GODEAU, S.; TAÏEB, A.; FRANCÈS, C. Treatment of refractory oral erosive lichen planus with topical rapamycin: 7 cases. **Dermatology**. 218: 22-5. 2009.

STRINGER, A.M; GIBSON, R.J; LOGAN, R.M; BOWEN, J.M; YEOH, A.S.J; 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, A.M; GIBSON, R.J; ; BOWEN, J.M; LOGAN, R.M; ASHTON, K; YEOH, A.S.J; AL-DASOOQUI, N; KEEFE, D.M. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Int J Exp Path**. 90: 489-499. 2009a.

SUKHOTNIK, I; POLLAK, Y; CORAN, A.G; PILATOV, J; BEJAR, J; MOGILNER, J.G. Glutamine attenuates the inhibitory effect of methotrexate on TLR signaling during intestinal chemotherapy-induced mucositis in a rat. **Nutr Metab (Lond)**. 11:17. 2014.

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

TAKIMOTO, C.H; WRIGHT, J.; ARBUCK, S.G. Clinical applications of the camptothecins. **Biochimica et Biophysica Acta**. 107-119. 1998.

THOMSON, A.W; TURNQUIST, H.R; RAIMONDI, G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. **Nat Rev Immunol**. 9: 324–337. 2009.

TRELINSKA, J; DACHOWSKA, I; KOTULSKA, K; JÓWZWIAK, S; FENDLER, W; MLYNARSKI, W. Everolimus treatment among patients with tuberous sclerosis affect serum lipid profile. **Pharmacological reports**. 68: 1002-1007. 2016.

TROTTI, A; BELLM, L.A; EPSTEIN, J.B. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. **Radiother Oncol**. 66: 253-262. 2003.

VAN CUTSEM, E.; TWELVES, C.; CASSIDY, J.; ALLMAN, D.; BAJETTA, E.; BOYER, M.; BUGAT, R.; FINDLAY, M.; FRINGS, S.; JAHN, M.; MCKENDRICK, J.; OSTERWALDER, B.; PEREZ-MANGA, G.; ROSSO, R.; ROUGIER, P.; SCHMIEGEL, W.H.; SEITZ, J.F.; THOMPSON, P.; VIEITEZ, J.S.; WEITZEL, C.; HARPER, P. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. **Journal of Clinical Oncology**. 19(21): 4097-4106. 2001.

VAN CUTSEM, E.; PEETERS, M.; SIENA, S.; HUMBLET, Y.; HENDLISZ, A.; NEYNS, B.; CANON, J.L.; VAN LAETHEM, J.L.; MAUREL, J.; RICHARDSON, G.; WOLF, M.; AMADO, R.G. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic cancer. **Journal of Clinical Oncology**. 25(13): 1658-1664. 2007.

VAN VLIET, M.J.; HARMSSEN, J.M.; de BONT, E.S.J.M.; TISSING, W.J.E. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **Plos Pathogens**. 6(5): 1-7. 2010.

VERA-LLONCH, M.; OSTER, G.; FORD, C.M.; LU, J.; SONIS, S. Oral mucositis and outcomes of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies. **Support Care Cancer**. 15: 491-496. 2007.

VERA-LLONCH, M.; OSTER, G.; HAGIWARA, M.; SONIS, S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. **Cancer**. 106: 329-336. 2006.

VOSS, M.H.; MOLINA, A.M.; MOTZER, R.J. mTOR inhibitors in advanced renal cell carcinoma. **Hematol Oncol Clin North Am**. 25: 835-52. 2011.

YAN, Z.; XIAOYU, Z.; ZHIXIN, S.; DI, S.; XINYU, D.; JING, X.; JING, H.; WANG, D.; XI, Z.; CHUNRONG, Z.; DAOXIN, W. Rapamycin attenuates acute lung injury induced by LPS through inhibition of Th17 cell proliferation in mice. **Nature Scientific Reports**. 1-11. 2016.

YARDLEY, D. A. Adverse event management of mtor inhibitors during treatment of hormone receptor positive advanced breast cancer: considerations for oncologists. **Clin. Breast Cancer** 14:297-308. 2014.

WALL, M.E.; WANI, M.C.; COOK, C.E.; PALMER, K.H. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **Journal of the American Chemical Society**. 88(16). 3888-3890. 1966.

WATAYA-KANEDA, M.; TANAKA, M.; NAKAMURA, A.; MATSUMOTO, S.; KATAYAMA, I. A topical combination of rapamycin and tacrolimus for the treatment of angiofibroma due to tuberous sclerosis complex (TSC): A pilot study of nine Japanese patients with TSC of different disease severity. **Br J Dermatol**. 165: 912-6. 2011.

WEICHHART, T.; COSTANTINO, G.; POGLITSCH, M.; ROSNER, M.; ZEYDA, M. *et al.* The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. **Immunity**. 29: 565-577. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 19/08/2016.

WONG, D.V.T. **Mediação dos receptores TLR2, NOD1 e da proteína adaptadora MyD88 na modulação da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano**. Fortaleza; 2013. [Tese de Doutorado-Universidade Federal do Ceará].

WONG, D.V.T; LIMA-JÚNIOR, R.C.P; CARVALHO, C.B.M; BORGES, V.F; WANDERLEY, C.W.S; BEM, A.X.C; LEITE, C.A.V.G; TEIXEIRA, M.A; BATISTA, G.L.P; SILVA, R.L; CUNHA, T.M; BRITO, G.A.C; ALMEIDA, P.R.C; CUNHA, F.Q; RIBEIRO, R.A. The adaptor protein MyD88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan induced intestinal mucositis. **Plos one**. 1-21. 2015.

WONG, R.; CUNNINGHAM, D. What is the impact of biologicals in colorectal cancer. **Targ Oncol**. (3)59-69. 2008.

WULLSCHLEGER, S; LOEWITH, R; HALL, M.N. mTOR signaling in growth and metabolism. **Cell**. 124: 471–484. 2006.

ZHOU, Y; RYCHAHOU, P; WANG, Q; WEISS, H.L; EVERS, B.M. TSC2/mTORC1 signaling controls Paneth and goblet cell differentiation in the intestinal epithelium. **Cell Death and Disease**. 6: 1-10. 2015.