



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

LÍVIA MARIA SOARES NOBRE

**ABATACEPT AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA
2017

LÍVIA MARIA SOARES NOBRE

ABATACEPT AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO
EM CAMUNDONGOS

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior

FORTALEZA

2017

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)

- N672a Nobre, Livia Maria Soares.
Abatacept agrava a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos / Livia Maria Soares
Nobre. – 2017.
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior.
1. Mucosite intestinal. 2. Irinotecano. 3. Abatacept. I. Título.

CDD 615.1

LÍVIA MARIA SOARES NOBRE

ABATACEPT AGRAVA A MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO
EM CAMUNDONGOS

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

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus e Nossa Senhora por toda proteção e dons concedidos.

A minha família pelo amor e apoio em todas as escolhas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha companhia invisível e amigo de conversas diárias por toda força, proteção e maravilhas que faz e ainda fará na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Junior, pela orientação desse trabalho, por estar sempre disponível para ajudar nos momentos de dúvida, com toda paciência e incentivo, por ser o melhor orientador que eu poderia ter, sempre otimista rebatendo meu pessimismo e me fazendo acreditar. Pelo excelente professor que é e pelo exemplo de amor à ciência.

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (in memoriam), pelo acolhimento quando me recebeu no laboratório, pelo exemplo de médico humanitário e pesquisador exemplar.

À banca de qualificação por todas as considerações, correções e sugestões para melhora deste trabalho.

À Profa. Ana Paula Negreiros por toda atenção, disponibilidade para realização das análises histológicas e exemplo de pesquisadora dedicada e acessível.

Aos meus pais Aldeniza Nobre e Raul Soares por serem meus pilares, por todo amor e apoio incondicional em todas as minhas escolhas, por toda compreensão, ensinamentos e companhia diários.

Aos colegas de laboratório Anielle Torres, Camila Meirelles, Wanderlei Lima, Carlos Wagner, Venúcia Magalhães, Camila Fernandes, Lucas Nicolau, Ana Paula Macedo, Lucas Carvalho, Renata Brito, Larisse Lucetti e Maraiza Teixeira, por toda ajuda e momentos de descontração.

À Camila Meirelles, Wanderlei Lima e Anielle Torres pelo auxílio imprescindível não só nos experimentos, mas nos diversos momentos em que precisei. Pela sinceridade e amizade que ultrapassam a pós-graduação.

À Deysi Wong pelos ensinamentos e acompanhamento paciente quando ingressei no laboratório.

Aos amigos/irmãos Débora Nishi, Marcus Vinícius, Raquel Viana e Vitor Gomes pelas quase duas décadas de amizade, conversas sem fim e apoio mútuo em todas as circunstâncias.

Aos meus amigos da graduação Ana Paula Dajtenko, Christiane Soares, Rozana Vieira, Mariane Cinthia, Lívia Correia e Chamini Lino, por cada riso, conselhos e por serem

um presente de Deus na minha vida. Ao Pedro Quintela, por todo incentivo e desabafos e por ter me apresentado ao Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer.

À Adenilde Amorim, por todo auxílio na realização desse trabalho, disponibilidade diária e pela amizade, fazendo jus ao apelido carinhoso de mainha.

Aos técnicos e enfermeiras do setor de Pulsoterapia do Hospital Universitário Walter Cantídio por sempre me atenderem tão atenciosamente, ajudando de forma essencial na realização desse trabalho.

Ao Alceu, pela disponibilidade de realização dos cortes histopatológicos.

Aos alunos de iniciação científica Ricardo Leal e Diego Bernarde pelo auxílio nos experimentos e pela amizade formada.

Aos técnicos do Biotério Setorial do departamento de Fisiologia e Farmacologia, Aauto e Moreira, por me ajudarem sempre que necessário, e pelo modo amável de atender os alunos.

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Introdução Mucosite intestinal (MI) é um efeito colateral bastante recorrente em pacientes submetidos ao tratamento com irinotecano, fármaco utilizado em esquemas terapêuticos de primeira linha no tratamento do câncer colorretal. Nas últimas décadas muitos aspectos relativos à patogênese da MI têm sido elucidados, entretanto, pouco se sabe sobre o perfil de células linfocitárias e o papel destas no seu desenvolvimento. O objetivo deste trabalho é, portanto, investigar o papel de linfócitos na patogênese da MI através da imunossupressão com abatacept. **Metodologia** Camundongos swiss machos, 20-25g, foram divididos em grupos (n=8) e tratados durante 4 dias com salina (5 mL/kg, i.p.), irinotecano (75 ou 45 mg/kg, i.p.), abatacept (10 mg/kg, i.p. 1h antes do irinotecano no primeiro dia) ou somente abatacept (10 mg/kg, i.p. no primeiro dia). Os animais foram avaliados diariamente quanto ao peso, escore de diarreia e sobrevida. A eutanásia ocorreu no dia 5 no primeiro protocolo e no dia 7 no segundo. Coletou-se sangue para a contagem total de leucócitos e após a eutanásia amostras de íleo foram extraídas para realização de ensaio de mieloperoxidase, análise histopatológica e dosagem de KC no íleo dos animais. Para análise estatística foram utilizados os testes ANOVA/Bonferroni, Kruskal-Wallis/Dunn's ou Log-rank (Mantel-Cox), com $p < 0,05$ aceito como significativo. **Resultados** Abatacept reduziu ($p < 0,05$) a sobrevida dos animais no primeiro protocolo, fazendo do dia 5 o ideal para eutanásia. Irinotecano causou perda ponderal significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina, entretanto abatacept não agravou a perda. O pré-tratamento com abatacept antecipou o aparecimento de diarreia de grau moderado para o quarto dia. Abatacept induziu redução na razão vilo/cripta, altura dos vilos e profundidade das criptas de forma significativa em relação ao grupo tratado somente com irinotecano ($p < 0,05$), além de aumentar o infiltrado de neutrófilos no íleo dos animais. Irinotecano aumentou o nível de KC no íleo dos animais em relação ao grupo salina, entretanto abatacept não modificou o nível desta citocina de forma significativa. No segundo protocolo, a subdose de irinotecano não provocou dano intestinal intenso, porém o tratamento com abatacept comprovou seu efeito deletério induzindo o aparecimento de diarréia no sexto dia ($p < 0,05$) em relação ao grupo salina, além de agravar o dano à arquitetura intestinal. Abatacept elevou a infiltração de neutrófilos no intestino dos animais tratados com irinotecano, em comparação ao grupo injetado apenas com esse fármaco ($p < 0,05$), o que foi associado com os níveis elevados de KC no intestino desses animais. Irinotecano promoveu mielotoxicidade em todas as doses, porém abatacept não agravou essa toxicidade. Abatacept

isoladamente não causou alteração em nenhum parâmetro avaliado. **Conclusão** Abatacept agravou a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.

Palavras-chave: Mucosite intestinal. Irinotecano. Abatacept.

ABSTRACT

ABATACEPT WORSENS IRINOTECAN-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE

Introduction Intestinal mucositis (IM) is a recurrent side effect in patients undergoing treatment with irinotecan, a drug used in first-line treatment regimens for the treatment of colorectal cancer. In the last decades many aspects related to the pathogenesis of IM have been discovered, however little is known about the lymphocyte cell profile and their role in its development. Here we aim to investigate the role of lymphocytes in the pathogenesis of IM through immunosuppression using abatacept. **Methods** swiss mice (20-25g) were divided into groups (n = 6-8) and injected for 4 days with saline (5mL / kg, i.p.), irinotecan (75 or 45 mg/kg, i.p.), abatacept (10 mg/kg, i.p. 1h before irinotecan on the first day) or abatacept only (10 mg /kg, ip on the first day). The animals were analyzed daily for weight loss, diarrhea and survival. The animals were euthanized on day 5 (first protocol) or day 7 (second protocol). Blood was collected for the total leukocyte count. Following animal euthanasia, ileum samples were collected for myeloperoxidase assay, histopathological analysis and cytokine levels. ANOVA / Bonferroni, Kruskal-Wallis / Dunn's or Log-rank tests were used for statistical analysis. $p < 0.05$ was accepted as significant. **Results** abatacept reduced ($p < 0.05$) the survival of the animals in the first protocol, and we choose day 5 for euthanasia. Irinotecan caused significant weight loss ($p < 0.05$) compared with the saline group, however abatacept did not worsen the loss. Pre-treatment with abatacept anticipated moderate-onset diarrhea for the fourth day. Abatacept induced a reduction in villi / crypt ratio, villi height and crypt depth significantly in relation to the irinotecan injection alone ($p < 0.05$). In addition to increasing the neutrophil infiltrate in the ileum of the animals, Irinotecan increased the level of KC in the ileus of the animals in relation to the saline group, however abatacept didn't modify the level of this cytokine. In the second protocol, the irinotecan subdose induced moderate intestinal damage, but the treatment with abatacept proved its deleterious effect inducing the onset of diarrhea on the sixth day ($p < 0.05$) in relation to the saline group, besides worsening the damage to intestinal architecture. Abatacept elevated neutrophil infiltration in the intestine of irinotecan-treated animals compared to the group injected with this drug alone ($p < 0.05$), which was correlated with the elevated KC levels in the intestine of these animals. Irinotecan promoted myelotoxicity at all doses, but abatacept did not aggravate this toxicity. Abatacept alone didn't change any of the evaluated parameters. **Conclusion** Abatacept aggravated irinotecan-induced intestinal mucositis in mice.

Keywords: Intestinal Mucositis. Irinotecan. Abatacept.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura química do irinotecano (CPT 11)	15
Figura 2	– Estrutura química do SN-38	16
Figura 3	– Metabolismo do irinotecano	17
Figura 4	– Hipótese para o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano	23
Figura 5	– Estrutura da imunoglobulina CTLA-4-like (Abatacept)	24
Figura 6	– Ativação efetiva de linfócitos T e inibição por abatacept	25
Figura 7	– Protocolo experimental I	33
Figura 8	– Protocolo experimental II	34
Figura 9	– Graus de diarreia de acordo com a intensidade após tratamento com irinotecano em camundongos.	36
Figura 10	– Efeito da injeção de abatacept sobre a variação de peso dos animais injetados com irinotecano (75 mg/kg) em função do tempo	41
Figura 11	– Efeito do abatacept na sobrevivência de animais injetados com irinotecano (75 mg/kg)	42
Figura 12	– Efeito do abatacept sobre os escores de diarreia em camundongos tratados com irinotecano (75 mg/kg)	42
Figura 13	– Efeito do abatacept sobre o dano intestinal no íleo dos animais tratados com irinotecano (75 mg/kg)	43
Figura 14	– Análise histopatológica do efeito do abatacept sobre o íleo dos animais tratados com irinotecano 75 mg/kg	44
Figura 15	– Efeito do abatacept sobre a análise morfométrica do íleo de animais tratados com irinotecano 75 mg/kg	45
Figura 16	– Efeito do abatacept na infiltração de neutrófilos no íleo dos camundongos tratados com irinotecano (75 mg/kg)	46
Figura 17	– Efeito do abatacept sobre a contagem total de leucócitos nos animais tratados com irinotecano (75 mg/kg)	46
Figura 18	– Efeito do abatacept na variação de massa corpórea de animais tratados com irinotecano 45 mg/kg	48
Figura 19	– Efeito do abatacept sobre a sobrevivência dos camundongos tratados com subdose de irinotecano	49

Figura 20	– Efeito do abatacept na diarreia em camundongos injetados com subdose de irinotecano	50
Figura 21	– Efeito do abatacept no íleo de animais tratados com subdose de irinotecano	51
Figura 22	– Análise histopatológica do efeito do abatacept sobre o íleo dos animais tratados com subdose de irinotecano	52
Figura 23	– Efeito do abatacept sobre a morfometria do íleo de animais tratados com subdose de irinotecano	53
Figura 24	– Efeito do abatacept na infiltração de neutrófilos no íleo dos camundongos tratados com subdose de irinotecano	54
Figura 25	– Efeito do abatacept sobre a contagem total de leucócitos em animais tratados com subdose de irinotecano	54
Figura 26	– Efeito do abatacept no nível de KC no íleo de camundongos tratados com irinotecano 75 mg/kg	55
Figura 27	– Efeito do abatacept no nível de KC no íleo de camundongos tratados com subdose de irinotecano	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma	14
Tabela 2 – Escores para avaliação do grau de diarreia em camundongos	35
Tabela 3 – Escores histopatológicos para análise de intestino delgado	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
ANOVA	Análise de variância
APC	7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina
APC	Célula apresentadora de antígenos
AR	Artrite reumatóide
CCR	Câncer colorretal
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPT-11	Irinotecano
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DMARDs	Drogas modificadoras da doença reumática
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimático
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Intraperitoneal
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRI	Irinotecano
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LT	Linfócito T
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MPO	Mieloperoxidase
Myd88	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de sódio
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear kappa B

NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo
NPC	7-etil-10 -(4-amino-1-piperidino)-carboniloxicamptotecina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PFA	Paraformaldeído
PBS	Tampão salina fosfato
SFB	Soro fetal bovino
SN38	7-etil-10-hidroxycamptotecina
SN38G	SN-38 glicuronídeo
TLR	Receptor Toll-like
TCR	Receptor de células T
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Gramma
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μL	Microlitro
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer	14
1.2	Irinotecano	15
1.3	Mucosite intestinal induzida por terapia antineoplásica	19
1.4	Abatacept	24
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Equipamentos e instrumentos	30
4.2	Drogas e soluções	31
4.2.1	<i>Drogas</i>	31
4.2.2	<i>Soluções</i>	31
4.2.3	<i>Corantes</i>	31
4.3	Animais	31
4.4	Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano	32
4.5	Protocolos experimentais	32
4.6	Avaliação do efeito do abatacept sobre os parâmetros gerais de indução da mucosite	34
4.6.1	<i>Determinação da sobrevivência</i>	34
4.6.2	<i>Avaliação ponderal</i>	34
4.6.3	<i>Avaliação do grau de diarreia</i>	35
4.6.4	<i>Contagem total de leucócitos</i>	36
4.6.5	<i>Análise histopatológica e morfometria do intestino</i>	37
4.7	Ensaio de mieloperoxidase (MPO)	38
4.8	Dosagem de KC nas amostras de intestino por Ensaio imunoenzimático (ELISA)	38
4.9	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Avaliação do efeito do abatacept sobre os parâmetros gerais de indução da mucosite	40

5.2	Dosagem do nível KC nas amostras de óleo por ensaio imunoenzimático (ELISA)	55
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o termo genérico utilizado para denominar um conjunto de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos podendo acometer qualquer parte do organismo. Estas células anormais possuem a capacidade de proliferar rapidamente e não respeitar as barreiras fisiológicas usuais, podendo invadir os tecidos adjacentes ou mesmo se espalharem para outros órgãos, causando metástases, sendo esta a principal causa de morte em decorrência do câncer (WHO, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 8,2 milhões de pessoas morrem a cada ano em virtude desta doença, o que corresponde a 13% do total de casos de óbito no mundo, e os principais tipos de câncer responsáveis por esses números são o de pulmão (1,59 milhões de mortes), fígado (745.000 mortes), estômago (723.000 mortes), câncer colorretal (694.000 mortes), mama (521.000 mortes) e câncer esofágico (400.000 mortes) (WHO, 2016). Vale ressaltar que cerca de 70% dos casos de óbito em decorrência dessa doença ocorre em países em desenvolvimento, onde o perfil dos tipos de câncer se assemelha ao dos países desenvolvidos em relação aos cânceres de mama, próstata e intestino, porém com persistência dos tipos relacionados a condições socioeconômicas menos favoráveis, como o do colo do útero e de estômago (BRASIL, 2016).

Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres, com cerca de 1,36 milhões de novos casos diagnosticados em 2012 e aproximadamente 624.000 mortes (WHO, 2012). O mesmo pode ser observado no Brasil (**tabela 1**), com estimativa de 16.660 novos casos de CCR em homens e 17.620 em mulheres, em 2016 (BRASIL, 2016).

Tabela 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma.

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%	Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%	Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%	Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%	Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%	Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%	Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%	Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%	Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Fonte: INCA, 2016.

Nas últimas décadas a terapia antineoplásica evoluiu permitindo o tratamento curativo de muitas neoplasias malignas antes consideradas fatais, e o surgimento de novos fármacos atuantes na terapia do câncer permitiram uma melhora considerável na qualidade de vida dos pacientes e aumento da sobrevida destes (BRUNTON, 2012).

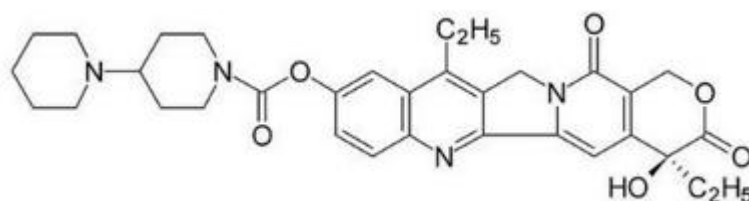
Os compostos antineoplásicos apresentam diferenças estruturais e podem atuar através de diversos mecanismos, como por exemplo, agentes alquilantes, análogos antimetabólitos do ácido fólico, das pirimidinas e das purinas, produtos naturais, hormônios e agentes alvo-específicos. Dentre as estratégias empregadas pelos antineoplásicos para conter a proliferação das células cancerosas, temos a inibição da divisão celular através da interação com o DNA, mecanismo pelo qual atua o irinotecano, fármaco base nos protocolos de tratamento do câncer colorretal (RANG & DALE 2016).

Devido ao fato da maioria dos quimioterápicos afetarem apenas a divisão celular, estes não exercem efeito na invasividade, na perda da diferenciação ou capacidade de induzir metástase. Além disso, como os fármacos convencionais não são seletivos para células tumorais, estes compostos afetam células normais, principalmente aquelas que constituem tecidos em divisão rápida, como medula óssea e epitélio gastrointestinal (RANG & DALE 2016).

1.2 Irinotecano

O irinotecano (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonitoxicamptotecina ou CPT-11) (**Figura 1**) é um análogo semi-sintético da camptotecina, um alcalóide extraído da planta chinesa *Camptotheca acuminata*, com solubilidade em água maior que a molécula que serviu como protótipo para seu desenvolvimento (RAMESH *et al.*, 2010; GERRITS *et al.*, 1997).

Figura 1. Estrutura química do irinotecano (CPT 11)

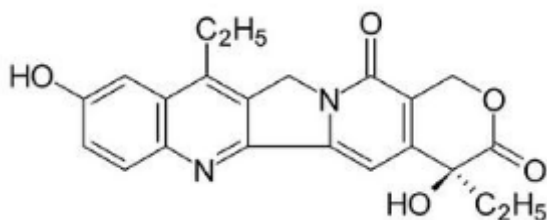


Fonte: RABBA, et al., 2011.

O irinotecano apresenta grande atividade antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo aprovado em 1994 para o tratamento de câncer cervical, de pulmão e de ovário, no Japão, e em 1996, nos Estados Unidos, para o tratamento de CCR metastático refratário à terapia com 5-Fluorouracil (FUJITA *et al.*, 2015). Nos últimos anos, o irinotecano tem sido utilizado como agente único ou combinado com outros quimioterápicos em protocolos para tratamento de primeira e segunda linha do câncer colorretal (SALTZ *et al.*, 2001), e também utilizado no câncer de ovário (FUJII *et al.*, 2002), linfoma de Hodgkin (RIBRAG *et al.*, 2003), câncer de pulmão de células pequenas e não pequenas (LANGER, 2004), pâncreas (ROCHA-LIMA *et al.*, 2004), mama (PEREZ *et al.*, 2004) e de estômago (ENZINGER *et al.*, 2005).

O irinotecano é um pró-fármaco e seu efeito tóxico se dá principalmente através do metabólito ativo SN-38 (**Figura 2**). No fígado, a enzima carboxilesterase cliva a cadeia lateral de piperidina presente na posição C-10 dando origem ao metabólito SN-38, o qual é cerca de 100 a 1.000 vezes mais ativo que o próprio irinotecano. Além disso, o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) do irinotecano é cerca de 13 horas, enquanto o seu metabólito mantém-se viável por 17-25 horas (RIVORY *et al.*, 1996).

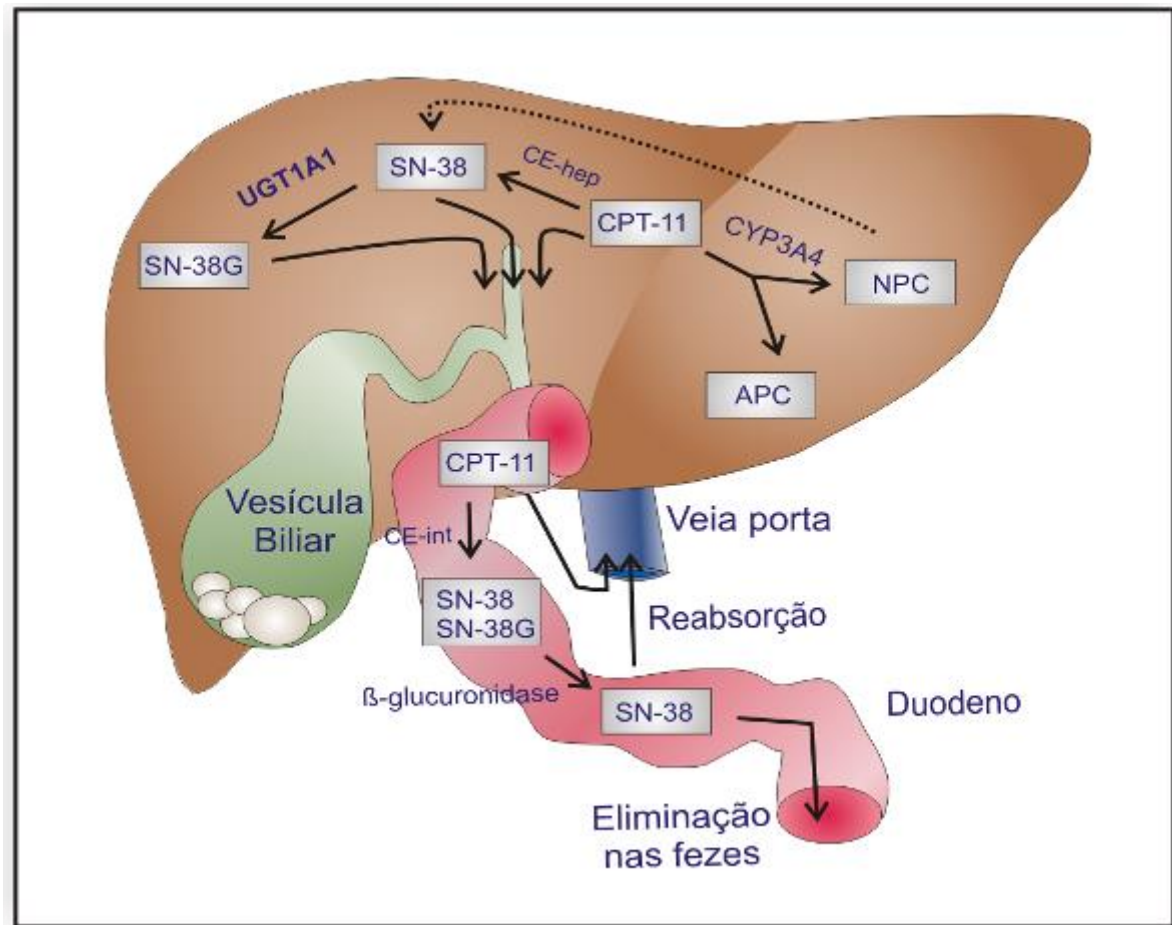
Figura 2. Estrutura química do SN-38



Fonte: RABBA, et al., 2011.

O irinotecano também pode ser metabolizado pela enzima hepática CYP3A4, gerando os metabólitos inativos APC e NPC, sendo este último substrato para carboxilesterase e quase completamente convertido a SN-38 (MATHIJSSSEN *et al.*, 2001; SPARREBOOM *et al.*, 1998). Após a conversão do irinotecano a SN-38, ocorre glucuronidação hepática com formação de glucuronídeos de SN-38 (SN-38G), inativos (IYER, et al., 1999). A eliminação se dá através das fezes (60 – 70%), bile (25%) ou urina (10 – 20%) (KANEDA *et al.*, 1997). No intestino, o SN-38G excretado na bile pode ser convertido a SN-38 pela ação das β -glucuronidases bacterianas presentes nas células intestinais e ser reabsorvido no sangue, no denominado ciclo entero-hepático do irinotecano (**Figura 3**) (TAKASUNA *et al.*, 1996).

Figura 3. Metabolismo do irinotecano



No fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o CPT-11 gerando os compostos inativos APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela carboxilesterase em SN-38. A depuração do SN-38 se dá no fígado pelo polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1), gerando glucuronídeos de SN-38 (SN-38G), inativos. CPT-11, SN-38 e SN-38G são excretados na bile no intestino delgado. No intestino, o CPT-11 pode ser clivado pela carboxilesterase intestinal, originando mais SN-38. Ainda no intestino, o SN-38G pode ser desconjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de β -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38, que por sua vez pode ser reabsorvido, no processo de recirculação êntero-hepática (TAKASUNA, et al., 1996; MATHIJSEN, et al., 2001; CHESTER, et al., 2003).

Fonte: RIBEIRO, R. A. Concurso para provimento ao cargo de professor titular de Farmacologia Geral, 2011.

O mecanismo citotóxico do irinotecano consiste na inibição seletiva da função da enzima topoisomerase I, enzima nuclear que se liga de modo covalente à fita dupla de DNA, levando à quebra de um único filamento da molécula e reduzindo, desta forma, a tensão de torção da mesma, o que permite a sua replicação. Após o relaxamento da tensão de torção do DNA, a topoisomerase I procede com o reparo da clivagem recém formada. O irinotecano

impede o reparo da fita-dupla de DNA, bloqueando, portanto, a divisão celular (BRUNTON, 2012).

Devido ao seu mecanismo de ação não seletivo para o alvo tumoral, a inibição da topoisomerase I também inibe a proliferação de células normais, induzindo severa toxicidade em aproximadamente 36% dos pacientes, onde a mielossupressão e a diarreia são os principais efeitos tóxicos dose-limitantes (KWEEKEL *et al.*, 2008; FUCHS *et al.*, 2003).

A diarreia, sintoma mais marcante na mucosite intestinal, é observada em até 80% dos pacientes em quimioterapia e está presente nos grau 3-4 (> 7 episódios de diarreia por dia havendo a necessidade de hidratação por um período superior a 24h) em até 25% dos pacientes em quimioterapia à base de irinotecano (KEEFE *et al.*, 2007).

São conhecidos dois tipos de diarreia induzidas pela terapia à base deste antineoplásico: a aguda e a tardia. A diarreia aguda, também chamada diarreia colinérgica, ocorre nas primeiras 24 horas após a administração do fármaco e se dá devido à inibição da atividade da acetilcolinesterase, por um mecanismo ainda não esclarecido. Outros sintomas relacionados à síndrome colinérgica são cólicas abdominais, hipersalivação, distúrbios de acomodação visual e com menos frequência bradicardia. Esses sintomas, de curta duração, são prevenidos pela administração subcutânea de atropina (ROUGIER *et al.*, 1997).

A diarreia tardia se desenvolve geralmente no quinto dia após a administração de irinotecano, e pode levar à desidratação e ao desequilíbrio eletrolítico, principalmente quando acompanhada de vômitos. O tratamento com loperamida em altas doses no início de qualquer evacuação de fezes moles reduz significativamente a incidência de diarreia de graus 3-4, entretanto, quando se instala intensa diarreia, os medicamentos antidiarreicos são ineficazes (PITOT *et al.*, 1997, apud KWEEKEL *et al.*, 2008). A diarreia associada ao irinotecano gera dano à qualidade de vida dos pacientes, aumentando os gastos do serviço de saúde, gerando necessidade de hospitalização em cerca de 33% dos pacientes e até morte (DRANITSARIS *et al.*, 2005).

Na clínica, a mielossupressão causada por derivados da camptotecina pode ser rapidamente controlada pela administração de fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), entretanto, a combinação de diarreia com neutropenia eleva em quatro vezes o risco de sepse nos pacientes, devido à destruição da barreira gastrintestinal (MASUBUCHI *et al.*, 2015; RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

Como resultado da indistinção entre células normais e tumorais, o irinotecano, assim como outras drogas citotóxicas que atuam impedindo a progressão da divisão celular,

causa importantes efeitos colaterais, dentre eles a mucosite intestinal, que causa prejuízo à qualidade de vida dos pacientes e pode determinar desde a redução do protocolo terapêutico até a completa interrupção do tratamento.

1.3 Mucosite intestinal induzida por terapia antineoplásica

A mucosite consiste numa séria complicação clínica que acomete pacientes submetidos à terapia antineoplásica, não existindo tratamento ou prevenção e que pode ser definida como quaisquer alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o aparelho gastrointestinal de maneira global ou localizada (cavidade oral – mucosite oral – ou mucosa intestinal – mucosite gastrintestinal). Os sintomas decorrentes da não seletividade dos agentes quimioterápicos sobre as células da mucosa gastrintestinal que estão em contínua proliferação são dor e ulceração da mucosa oral, diarreia, vômitos e hemorragias, inchaço abdominal, úlceras anorretais, dispepsia, entre outras (LOGAN *et al.*, 2008; GIBSON & KEEFE, 2006).

Tais sintomas causam considerável dano à qualidade de vida dos pacientes e à progressão do esquema terapêutico, levando a redução das doses de antineoplásicos, interrupção não planejada do tratamento, aumento da necessidade de hospitalização e ocasionalmente morte (GIBSON *et al.*, 2007). Estima-se que cerca de 15 a 40% dos pacientes em quimioterapia antineoplásica utilizando doses padrões de antineoplásicos apresentam algum grau de mucosite, e que praticamente todos os pacientes em tratamento com altas doses desses compostos ou aqueles submetidos a transplante de medula óssea ou células tronco desenvolvem mucosite (ELTING *et al.*, 2003; RUBENSTEIN *et al.*, 2004; GIBSON & KEEFE, 2006; ELTING *et al.*, 2007), podendo modificar a intensidade, duração e eficácia do tratamento em cerca de 50% dos casos (SCULLY; SONIS, 2006).

Diferentemente de efeitos colaterais comuns a pacientes em terapia contra o câncer, como náuseas ou neutropenia, que são relativamente bem controlados, não há nenhum tratamento curativo para a mucosite intestinal, sendo o manejo clínico limitado à utilização de fármacos para o alívio da dor e utilização da loperamida, um opióide não-analgésico, para contenção dos eventos diarreicos (GIBSON *et al.*, 2007).

A mucosite pode ser causada por várias drogas antineoplásicas, através de diferentes mecanismos de dano à mucosa do trato gastrointestinal (LOGAN *et al.*, 2009). No tratamento do CCR metastático, os esquemas de primeira linha são compostos geralmente por

fluoropirimidinas (5-fluorouracil ou capecitabina) juntamente com leucovorin e oxaliplatina (FOLFOX e FLOX) ou irinotecano (FOLFIRI), onde tanto irinotecano como 5-fluorouracil causam mucosite, principalmente mucosite intestinal, com vacuolização das células epiteliais, apoptose das células das criptas, hipersecreção de mucina e considerável diarreia (DUNCAN & GRANT, 2003; JONES *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas o interesse na patogênese da mucosite intestinal cresceu, levando à identificação de muitos dos mecanismos relacionados com a mesma, a partir da utilização de modelos animais. O Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) nos últimos anos desenvolveu e aprimorou modelos experimentais de mucosite intestinal induzida por antineoplásicos, de forma a contribuir com a elucidação das vias pelas quais esta se desenvolve.

No modelo de mucosite induzida por irinotecano, nosso grupo observou que a administração de irinotecano na dose de 75mg/kg em camundongos causa significativa diarreia no sexto e sétimo dia após o início do tratamento, além de encurtamento dos vilos, perda de arquitetura das criptas e infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (MELO *et al.*, 2008). No mesmo trabalho, o tratamento com irinotecano eleva os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e KC (citocina análoga a IL-8 humana nos camundongos) e a utilização de pentoxifilina e talidomida reduziu consideravelmente os danos intestinais, o infiltrado de neutrófilos no intestino e os níveis de IL-1 β e TNF- α , além de KC (somente pentoxifilina). Um resumo dos mediadores envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano pode ser visto na **Figura 4**.

Como citado anteriormente, os mecanismos pelos quais diferentes drogas antineoplásicas causam mucosite apresenta suas particularidades, e outro perfil de mediadores inflamatórios está envolvido, como por exemplo, PAF e IL-4 na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil (SOARES *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2013) e óxido nítrico na mucosite intestinal induzida por metotrexato e na mucosite oral induzida por 5- fluorouracil (LEITÃO *et al.*, 2007; LEITÃO *et al.*, 2011).

Na patogênese da mucosite oral induzida por quimio e radioterapia, acredita-se que a ativação de NF- κ B por tais esquemas de tratamento leve ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6. De fato, o aumento no nível dessas citocinas tem sido demonstrado tanto nas mucosas como no sangue periférico dos pacientes em tratamento contra o câncer. (HALL *et al.*, 1995; SONIS, 2004). De forma semelhante, Logan *et al.* (2008) observaram que ratos submetidos a tratamento com irinotecano apresentaram ulceração e atrofia da mucosa oral, redução do comprimento de vilos e

infiltração de neutrófilos no jejuno, além de aumento na imunomarcação de NF- κ B, IL-6 e TNF- α na mucosa (LOGAN *et al.*, 2008).

Em outro estudo, avaliou-se o papel do óxido nítrico (NO) na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano, utilizando animais knockout para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou tratados com aminoguanidina, um inibidor desta enzima. A utilização de animais knockout para iNOS ou o tratamento dos animais com aminoguanidina previniu o desenvolvimento de lesão intestinal, assim como o aparecimento de diarreia e a infiltração de neutrófilos na lâmina própria intestinal (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Neste contexto há também participação da interleucina 18 (IL-18), onde a mesma, juntamente com TNF- α , aumenta a expressão de iNOS, com formação de NO e consequentemente radicais como peroxinitrito, que parece ser um dos mediadores da lesão à mucosa observada nesse modelo (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014). Neste trabalho, Lima-Júnior (2014) demonstrou que animais knockout para IL-18 ou animais submetidos à administração sistêmica da proteína ligante de IL-18 (IL-18bp) apresentaram redução na atividade da enzima iNOS, além da redução dos danos funcionais (diarreia e hipercontratibilidade intestinal), inflamatórios (redução do infiltrado neutrofílico) e estruturais (redução do dano à arquitetura das criptas e altura dos vilos, além de diminuição do número de células apoptóticas e da vacuolização celular) (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012).

Nosso grupo demonstrou, ainda, o papel dos receptores *Toll-like* e da proteína adaptadora MyD88, envolvida na sinalização de receptores *Toll*, na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano, onde a modulação genética para MyD88 e receptor toll-like do tipo 2 preveniu o dano à mucosa intestinal e o desenvolvimento de diarreia, além de aumentar a sobrevivência e reduzir a translocação bacteriana. Animais knockout para os receptores NOD1 e TLR9 somente apresentaram melhora da diarreia e do processo inflamatório, respectivamente (WONG *et al.*, 2015). Segundo Wong (2015), os patógenos e os padrões moleculares associados à patógenos e danos (PAMPs e DAMPs) ativam receptores Toll-like dos tipos 2 e 9. A sinalização desses receptores ocorre através da molécula adaptadora MyD88 e do fator 6 associado ao TNF (TRAF6), ativando o fator de transcrição NF- κ B, provocando a síntese de mediadores pró-inflamatórios. O recrutamento de neutrófilos e outras células inflamatórias levam à amplificação do dano à mucosa intestinal e desenvolvimento da mucosite (WONG *et al.*, 2015).

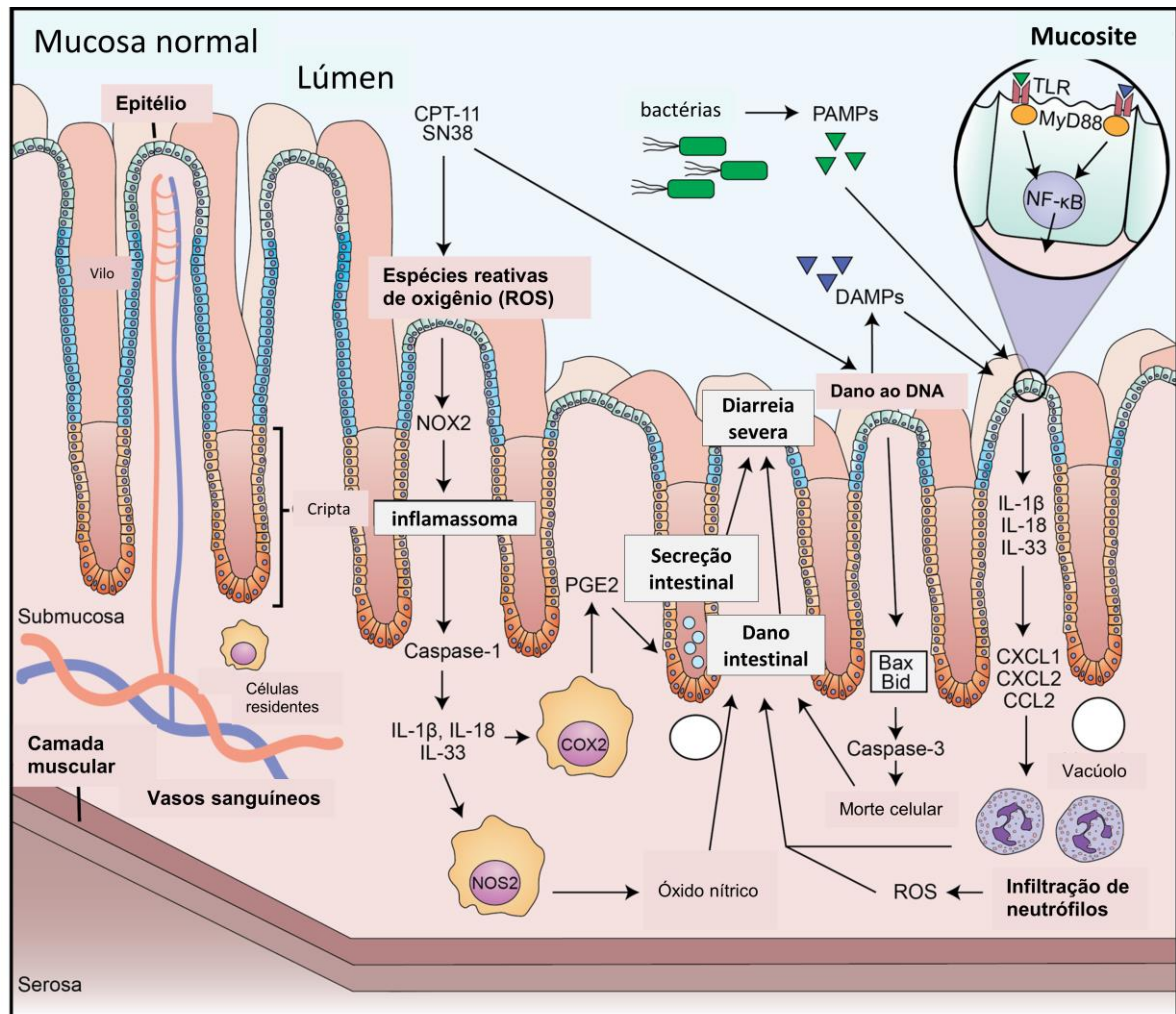
Em 2013, o Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer padronizou um novo modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-FU nas

doses de 45mg/Kg e 37,5 mg/Kg respectivamente. Observou-se que a associação destas doses induziram mucosite intestinal no sétimo dia com níveis de mortalidade aceitáveis, significativa diarreia, perda expressiva de massa corpórea, dano à mucosa intestinal, infiltração de neutrófilos, leucopenia e aumento de citocinas (TNF- α e IL-6), sendo este o modelo experimental que mais se aproxima da prática clínica (PEREIRA *et al.*, 2016).

Dados mais recentes (não publicados) do nosso grupo mostram o perfil de linfócitos T regulatórios (Treg) e T helper 17 (Th17) tanto no intestino como sistemicamente no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano. Irinotecano induz aumento nos níveis de células Treg e Th17 no sétimo dia após a primeira injeção de irinotecano, e o tratamento com uma baixa dose de ciclofosfamida, droga que reconhecidamente depleta linfócitos Treg, reduz a sobrevivência desses animais, com perda de massa corporal, agravamento da diarreia e aumento da infiltração de neutrófilos. Em contrapartida, com a depleção de células Tregs, houve aumento na frequência dos outros subtipos linfocitários, indicando uma compensação do perfil anti-inflamatório (Tregs) por um pró-inflamatório, o qual parece estar envolvido na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (dados não publicados).

Apesar do crescente interesse no estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por diferentes compostos antineoplásicos ter permitido a elucidação de vários mecanismos relacionados ao desenvolvimento deste efeito adverso, principalmente com relação aos mediadores inflamatórios envolvidos, pouco se sabe acerca do perfil de linfócitos presentes nesse processo. Desta forma, uma das formas de se investigar o papel de linfócitos na patogênese da mucosite intestinal envolve a modulação farmacológica com drogas imunossupressoras, como o abatacept.

Figura 4. Hipótese para o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano

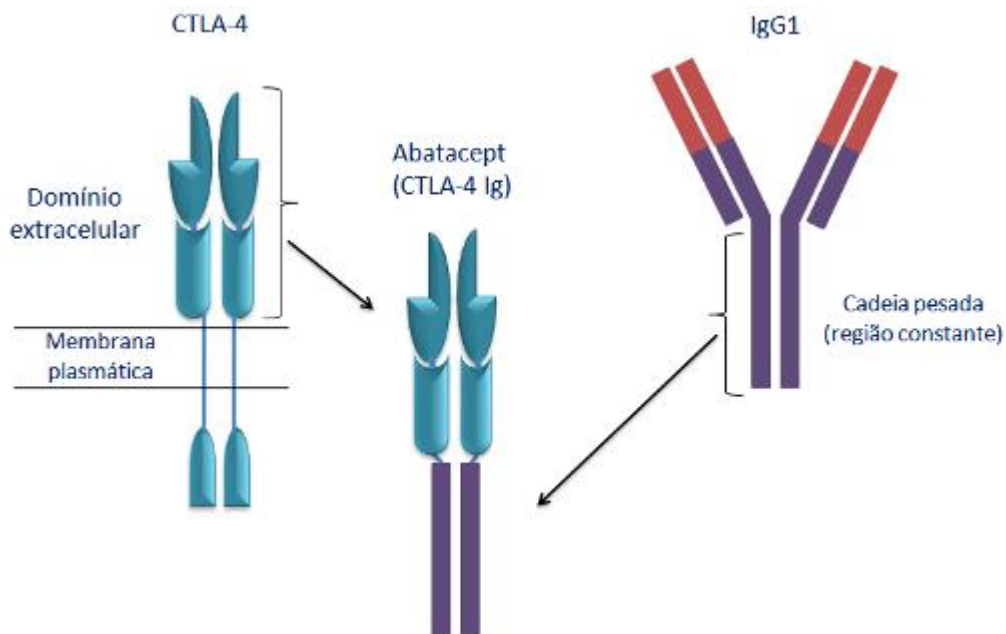


Irinotecano e SN-38 induzem a morte celular por apoptose através da geração de espécies reativas de oxigênio, com consequente ativação de inflamassomo e do processamento de pró-IL-1, pró-IL-18 e pró-IL-33 em citocinas maduras, dependente de caspase-1. Essas citocinas induzem as células residentes a expressar COX-2 e iNOS, levando à consequente produção de prostaglandinas e óxido nítrico, resultando em dano intestinal. Adicionalmente, Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) estimulam receptores *Toll like*, os quais sinalizam via MyD88 ativando NF-κB e culminando na síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-18 e IL-33, contribuindo para a produção de quimiocinas e o recrutamento de neutrófilos para o local, além de amplificar a geração de espécies reativas de oxigênio e o dano à mucosa (RIBEIRO et al., 2016).

1.4 Abatacept

Abatacept é um fármaco de constituição protéica utilizado no tratamento da artrite reumatóide (AR) em pacientes com resposta inadequada ou intolerantes à metotrexato ou infliximabe (TENG *et al.*, 2005). O fármaco consiste na fusão entre a porção extracelular da proteína associada ao linfócito T citotóxico- 4 (CTLA-4) humana e uma porção Fc de imunoglobulina G1 humana (**Figura 5**), e atua inibindo a ativação e proliferação de linfócitos T (EMERY, 2003; GENOVESE *et al.*, 2005).

Figura 5. Estrutura da imunoglobulina CTLA-4-like (Abatacept)



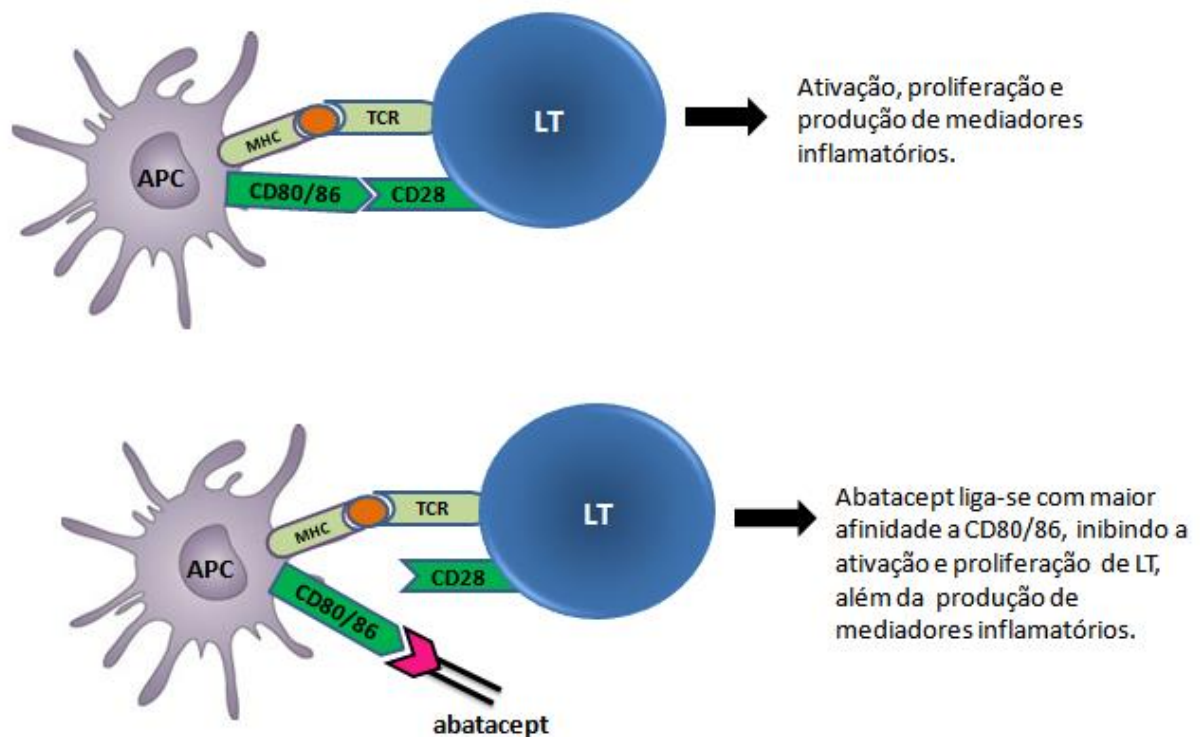
Fonte: próprio autor

A ativação eficaz das células T requer a participação de dois tipos de receptores nas células apresentadoras de antígenos (APCs). Primeiramente, antígenos previamente processados pelas APCs são apresentados às células T via moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), que interagem com os receptores de células T (YAMADA *et al.*, 2002; JANEWAY & TRAVERS, 2005). Um segundo sinal, através da interação das moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 nas APCs e o receptor CD28 nos linfócitos T, leva à ativação das células T, com produção de interleucina-2 e proliferação destas células (DUBOIS & COHEN, 2009). Cerca de 24 a 48 horas após a ativação das células T, inicia-se um mecanismo regulatório de inativação dessa resposta, o qual consiste na expressão de CTLA-4 na membrana celular de linfócitos T. CTLA-4 é uma molécula estruturalmente homóloga ao

CD28, que se liga à CD80/86 com maior afinidade, bloqueando a ativação das células T. Por se tratar de uma imunoglobulina contendo a porção extracelular de CTLA-4, abatacept atua pelo mesmo mecanismo (**Figura 6**) (THOMPSON *et al.*, 1989; PERKINS *et al.*, 1996; MORELAND *et al.*, 2006).

A região Fc do abatacept é geneticamente modificada para que esta não se una aos receptores CD16, CD32 e CD64, impedindo o desenvolvimento de respostas celulares mediadas pelo receptor Fc, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpo e a citotoxicidade dependente do complemento, ambas promovendo a lise celular. Esta modificação estrutural bloqueia, portanto, o aparecimento de efeitos adversos que poderiam determinar a necessidade de intervenção terapêutica (DAVIS *et al.*, 2007).

Figura 6. Ativação efetiva de linfócitos T e inibição por abatacept



A ativação efetiva de linfócitos T (LT) requer a participação de dois tipos de receptores presentes na membrana das células apresentadoras de antígenos (APC). Primeiramente antígenos são apresentados às células T através do MHC, ligando-se ao receptor de células T (TCR), após essa ligação, um segundo sinal é requerido para a completa ativação de LT, o qual consta na interação entre as moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 na APC e CD28 na célula T. A ação combinada desses dois sinais leva à ativação e proliferação dos LTs além de produção de citocinas. Abatacept, uma imunoglobulina CTLA-4-like atua ligando-se a CD80/86 com maior afinidade que CD28, contendo a resposta celular (PERKINS *et al.*, 1996; YAMADA *et al.*, 2002; JANEWAY & TRAVERS, 2005; DUBOIS & COHEN, 2009).

Como citado anteriormente, abatacept é utilizado principalmente no tratamento da artrite reumatóide. O tratamento desta baseia-se na utilização de drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (do inglês, disease-modifying anti-rheumatic drugs, ou DMARDs), como por exemplo, ciclosporinas, metotrexato e sulfasalazina (SAAG *et al.*, 2008; O'DELL *et al.*, 2013). Com o avanço das pesquisas no desenvolvimento de fármacos anti-artrite, uma nova classe de agentes foi incorporada aos esquemas de tratamento para o caso dos pacientes não-responsivos ou intolerantes à monoterapia com DMARDs. Essas drogas, denominadas genericamente de terapias biológicas, apresentam ação mais rápida que a terapia com DMARDs convencionais e possuem como componentes da classe infliximabe, rituximab, anankira, abatacept, entre outros (SAAG *et al.*, 2008).

As primeiras evidências da eficácia de abatacept no tratamento da AR consistem em modelos experimentais onde a administração de CTLA-4-Ig melhora a AR induzida por colágeno em camundongos, com sucesso em suprimir a ativação e proliferação de células T, além de reduzir a produção de mediadores inflamatórios, como IL-17, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (KNOERZER *et al.*, 1995; PLATT *et al.*, 2010; KO *et al.*, 2010). Após isso, vários ensaios clínicos têm demonstrado sua eficácia em humanos (KÖLLER, 2007). Nesses casos, abatacept é utilizado na dose de 10 mg/kg, e apresenta meia-vida de, em média, 13 dias (MORELAND *et al.*, 2002). Nessa dose, o tratamento com abatacept reduz a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a resposta inflamatória, reduzindo os níveis de receptores solúveis de IL-2, IL-6, TNF- α , fator reumatóide e proteína C reativa, melhorando os sintomas na AR (WEISSMAN *et al.*, 2006). Estudos clínicos mostram, ainda, que pacientes com psoríase e artrite psorítica refratários a DMARDs submetidos a tratamento com abatacept apresentaram melhora moderada nas lesões de pele, em comparação com placebo (ABRAMS *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2010; MEASE *et al.*, 2011).

Outra doença em que o abatacept poderia vir a ter ação terapêutica seria o Lupus eritematoso sistêmico (LES). O LES é caracterizado pela ativação de linfócitos T e B, onde as células B, além de secretarem anticorpos e citocinas, promovem a apresentação de peptídeos para células T. A inibição da co-estimulação pelo abatacept inibiria não apenas a ativação e expansão de linfócitos T, mas também esta interação entre linfócitos B e T (DANION *et al.*, 2016). Abatacept tem se mostrado eficaz em modelos animais de lúpus, entretanto, testes clínicos em pacientes com lúpus renal e nefrite em decorrência do lúpus não demonstraram diferença com relação ao placebo (DAIKH *et al.*, 1997; DAIKH *et al.*, 2001; MERRILL *et al.*, 2010; FURIE *et al.*, 2014).

Um estudo conduzido em pacientes com LES refratários à terapia convencional

demonstrou melhora em 70% destes, principalmente naqueles com envolvimento de articulações (DANION *et al.*, 2016). A utilização de abatacept para o tratamento de lupus é bastante promissor, principalmente devido ao seu perfil de segurança, o qual poderia ser indicado para os casos refratários à terapia utilizada atualmente, porém ainda é necessária uma maior investigação e a realização de mais ensaios clínicos para que esta terapia seja utilizada na prática (HOI & LITTLEJOHN, 2012).

A imunossupressão com abatacept tem sido bastante utilizada em modelos experimentais de artrite reumatóide, com objetivo de melhor determinar o papel de linfócitos T em sua patogênese (KLIWINSKI *et al.*, 2005; KO *et al.*, 2010; PLATT *et al.*, 2010; ALI *et al.*, 2015; JANSEN *et al.*, 2015) e em modelos animais de transplante (RIELLA *et al.*, 2012; SCHWARZ *et al.*, 2016).

Sabe-se que AR é caracterizada por infiltração de células inflamatórias na sinóvia, entre elas linfócitos T ativados, com papel fundamental na cronificação desta patologia. Estas células ativadas proliferam e estimulam monócitos, macrófagos e fibroblastos a produzirem citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 (CHOY, PANAYI, 2001).

Abatacept comprovadamente causa depleção de linfócitos em modelos experimentais (PLATT *et al.*, 2010; PATAKAS *et al.*, 2016). Em modelo de AR induzida por sensibilização dos animais com ovoalbumina, abatacept na dose de 10mg/kg previne a completa ativação de células T antígeno-específicas, além de bloquear a migração destas e reduzir os níveis de citocinas como IL-17 e IFN- γ nos linfonodos dos animais sensibilizados (PLATT *et al.*, 2010).

Kliwinski e colaboradores (2005) demonstraram em modelo experimental de AR induzida por colágeno em ratos que abatacept reduz os níveis de anticorpos dirigidos contra essa proteína, além de inibir a produção de mediadores inflamatórios relacionados com células T, como IL-2 e IFN- γ , determinado pela mensuração dos níveis sistêmicos destas, e IL-6, demonstrado pela menor imunomarcagem para esta no foco inflamatório (KLIWINSKI *et al.*, 2005).

O comprovado efeito imunossupressor de abatacept, seu perfil de segurança e aspectos farmacocinéticos faz com que esta imunoglobulina seja utilizada, além da clínica, em modelos animais nos quais objetiva-se estudar o efeito de linfócitos T em determinada patogênese, como no nosso caso.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer representa a segunda causa de morte mundialmente, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo mais comumente diagnosticado em homens e o segundo em mulheres, com uma estimativa de ocorrência de 16.660 novos casos de CCR em homens e 17.620 em mulheres, no Brasil, em 2016. A terapia antineoplásica do CCR baseia-se em esquemas que geralmente utilizam irinotecano em combinação com fluoropirimidinas.

Apesar do considerável avanço no conhecimento de fatores prognósticos, desenvolvimento de técnicas cirúrgicas e novas terapias antineoplásicas que possibilitaram uma melhora significativa nas taxas de sobrevida global dos pacientes com câncer, os efeitos colaterais decorrentes da ação não-seletiva desses compostos antineoplásicos podem ocasionar desde redução do esquema terapêutico à sua total interrupção, com prejuízo no tratamento oncológico. Dentre estes efeitos colaterais, destaca-se a mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Como não existem meios efetivos para amenizar os efeitos da mucosite na maioria dos casos, os pacientes ainda sofrem com sintomas desconfortáveis, sendo o principal deles a diarreia, que pode levar a uma possível redução na eficácia do tratamento oncológico devido a atrasos e reduções de doses, além de estar relacionada com o maior risco de desenvolvimento de sepse.

Nas últimas décadas muito se tem descoberto acerca da patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano, porém muitos mecanismos ainda não foram elucidados. Não se sabe, por exemplo, a importância dos linfócitos no processo fisiopatológico da mucosite, sendo este o objetivo desse trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o papel do abatacept na patogênese da mucosite intestinal induzida pela quimioterapia antineoplásica à base de irinotecano.

3.2 Específicos

- Avaliar o impacto do abatacept na sobrevida dos animais tratados com irinotecano.
- Caracterizar a indução da mucosite intestinal segundo parâmetros gerais de lesão, como diarreia, curva ponderal, análise histopatológica e morfometria intestinal.
- Determinar a influência do tratamento com abatacept sobre a resposta inflamatória durante a mucosite intestinal induzida por irinotecano.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Equipamentos e instrumentos

- Agitador magnético TE 089
- Agitador Vortex Cetormart MV
- Autoclave Stermax
- Balança analítica Bioprecisa FA2104N
- Balança Filizola MF
- Câmara de contagem Neubauer
- Capela Permution – capela evolution
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- Espectrofotômetro Biotek ELX 800
- Estufa Shel lab
- Freezer -80°C Thermo Scientific
- Funis de vidro
- Homogeneizador de soluções AP 22 Phoenix Lufenco
- Lâmina lisa para microscopia 26x76 mm
- Lamínula 24x32 mm
- Material cirúrgico
- Micropipeta multicanal Gilson (200 µL)
- Micropipetas Eppendorf (20, 200 e 1000 µL)
- Micropipetas Gilson (20, 200 e 1000 µL)
- Microscópio óptico Olympus BX41
- Nanodrop Biotek Epoch Newroute
- Placa estéril de 96 poços
- Tubos de falcon de 15 mL

4.2 Drogas e soluções

4.2.1 Drogas

- Irinotecano (ampolas com 100mg/5mL, Eurofarma);
- Abatacept (frasco-ampola com 250mg, Bristol-Myers Squibb)
- Tribromoetanol 2,5%
- Heparina sódica (ampolas com 0,25 mL, Cristália)

4.2.2 Soluções

- Ácido sulfúrico
- Álcool 70%
- Dimetil Sulfóxido a 100% (Merk)
- Formol tamponado a 10%
- Peróxido de hidrogênio 30%
- Solução de Turk
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%)
- Tampão 1 para MPO (NaCl, EDTA dissódico e tampão fosfato de sódio)
- Tampão de lise (NaCl a 0,2%)
- Tampão fosfato de sódio
- Tampão HTAB (hexadeciltrimetilamônio)

4.2.3 Corantes

- Hematoxilina (Merck)
- Eosina (Merck)

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos swiss machos, pesando entre 20-24 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os animais foram mantidos em gaiolas adequadas, com 8 animais cada, em um ambiente com temperatura controlada (22-25°C), exaustão de ar, ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*, respeitando o número máximo de animais por gaiola. Os experimentos foram realizados de acordo com os preceitos do Comitê de Ética em Uso Animal da UFC, após aprovação no mesmo, com protocolo 11/15.

4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano

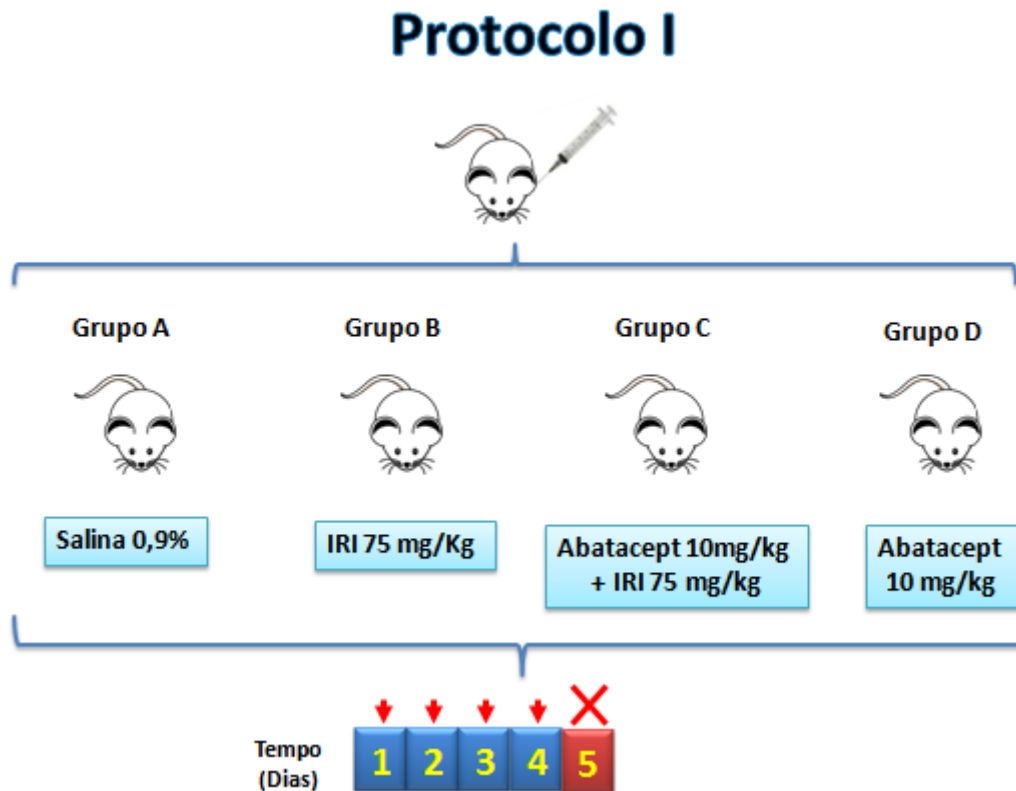
A mucosite intestinal foi induzida de acordo com o protocolo desenvolvido por Melo et al., (2008), onde os camundongos receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de solução salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.), Irinotecano (75 mg/kg, i.p.) ou Irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) administrados uma vez ao dia durante quatro dias consecutivos, realizando as aplicações sempre no mesmo horário. A utilização de subdose de irinotecano baseia-se no trabalho de Lima-júnior (2012) o qual observou que essa dose não induz mucosite intestinal em camundongos swiss. A eutanásia dos animais foi realizada no 5º dia (protocolo I) ou no 7º dia (protocolo II) após a primeira injeção de irinotecano.

Para o pré-tratamento com abatacept, utilizou-se a dose de 10mg/kg, sendo esta a dose utilizada na clínica e em modelos animais (WEISMAN *et al.*, 2006; KÖLLER, 2007; PLATT *et al.*, 2010; PINELLI *et al.*, 2013; NORLIN *et al.*, 2016; PATAKAS *et al.*, 2016).

4.5 Protocolos experimentais

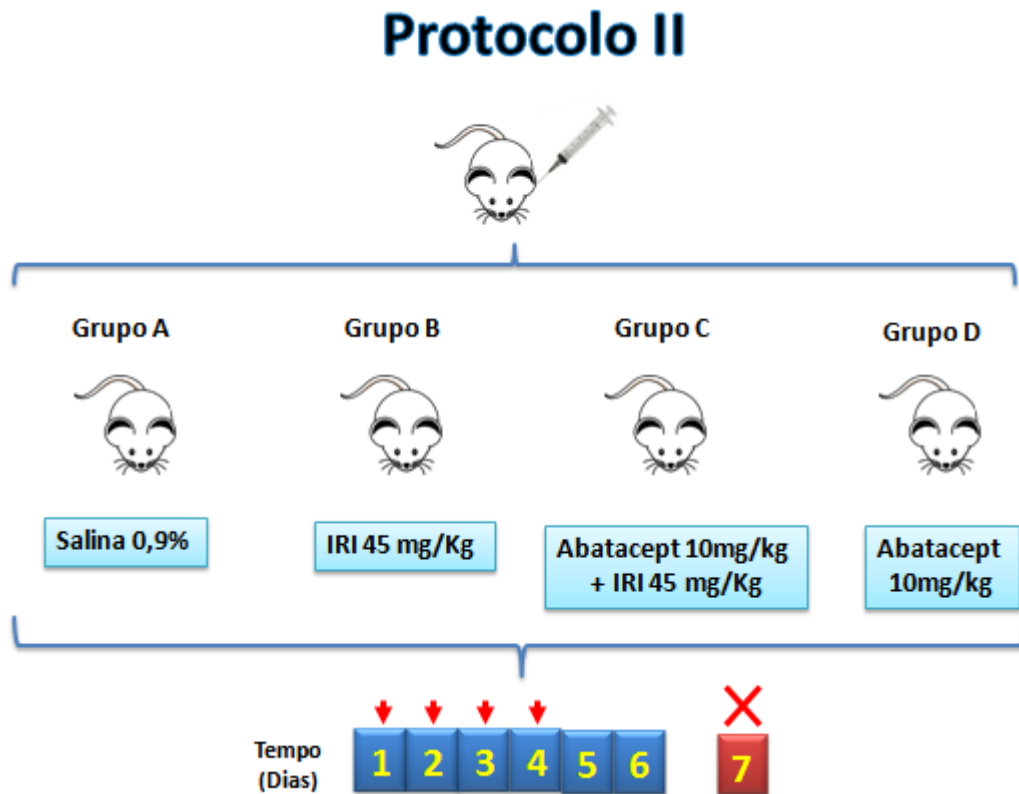
Protocolo I: Os camundongos foram divididos em grupos (n=6-8), onde: **Grupo A:** controle negativo injetado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg 1x/dia/4 dias, i.p.); **Grupo B:** camundongos injetados com irinotecano (75 mg/Kg/1x/dia/4 dias, i.p.); **Grupo C:** camundongos injetados com abatacept (10 mg/Kg, no primeiro dia de tratamento, uma hora antes do irinotecano, i.p.) + irinotecano (75 mg/Kg/1x/dia/4 dias, i.p.); **Grupo D:** abatacept (10 mg/Kg, no primeiro dia de tratamento, i.p.) (**Figura 7**).

Figura 7. Protocolo experimental I



Os animais foram divididos em quatro grupos e tratados durante 4 dias com: salina 0,9%, 5 mL/kg (grupo A); irinotecano 75 mg/kg (grupo B); abatacept 10 mg/kg no primeiro dia de tratamento, 1 hora antes do irinotecano 75 mg/kg (grupo C) ou somente abatacept 10 mg/kg no primeiro dia experimental (grupo D). A eutanásia ocorreu no quinto dia experimental. Fonte: próprio autor

Protocolo II: camundongos swiss machos foram divididos em grupos (n=6-8), onde: **Grupo A:** controle negativo injetado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo B:** camundongos injetados com subdose de irinotecano (45 mg/Kg/1x/dia/4 dias, i.p.); **Grupo C:** camundongos injetados com abatacept (10 mg/Kg, no primeiro dia de tratamento, uma hora antes do irinotecano, i.p.) + irinotecano (45 mg/Kg/1x/dia/4 dias, i.p.); **Grupo D:** abatacept (10 mg/Kg, no primeiro dia de tratamento, i.p.) (**Figura 8**).

Figura 8. Protocolo experimental II

Os animais foram divididos em quatro grupos e tratados durante 4 dias com: salina 0,9%, 5 mL/kg (grupo A); irinotecano 45 mg/kg (grupo B); abatacept 10 mg/kg no primeiro dia de tratamento, 1 hora antes do irinotecano 45 mg/kg (grupo C) ou somente abatacept 10 mg/kg no primeiro dia experimental (grupo D). A eutanásia ocorreu no sétimo dia experimental. Fonte: próprio autor

4.6 Avaliação do efeito do abatacept sobre os parâmetros gerais de indução da mucosite.

4.6.1 Determinação da sobrevivência

Os animais foram observados diariamente quanto em relação à mortalidade desde o dia 1 da administração de irinotecano até a eutanásia.

4.6.2 Avaliação Ponderal

Os animais foram submetidos à pesagem diariamente durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos em % de variação de peso.

4.6.3 Avaliação do grau de diarreia

Os animais foram avaliados diariamente com relação ao grau de diarreia, através da separação destes utilizando funis de vidro. Cada animal foi observado pelo tempo necessário até a defecação. Aos eventos de evacuação apresentados após o início do tratamento dos animais com quimioterapia à base de Irinotecano, foram atribuídos os seguintes escores (**Tabela 2**): escore 0 = fezes com aspecto normal; escore 1 = fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; escore 2 = fezes úmidas com pouca sujidade perianal; escore 3 = fezes úmidas com bastante sujidade perianal (KURITA et al., 2000). A diarreia representa um indicativo de indução da mucosite, sendo o evento mais comumente observado na clínica.

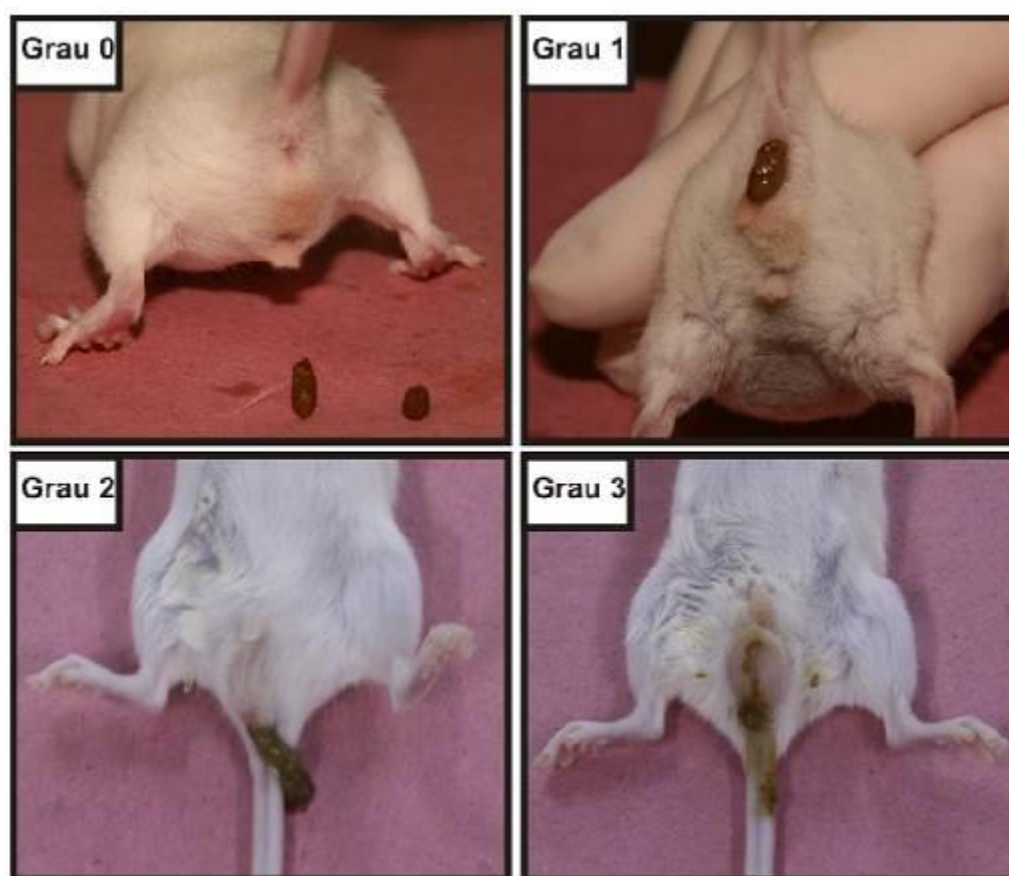
Adicionalmente, considerou-se escore 4 para daqueles animais que vieram a óbito em decorrência da presença de diarreia durante o período que compreendeu o início do tratamento até o dia da eutanásia.

Tabela 2. Escores para avaliação do grau de diarreia em camundongos

<i>Escore</i>	<i>Avaliação da diarreia</i>
Escore 0	Fezes com aspecto normal
Escore 1	Fezes levemente alteradas e pouco umedecidas
Escore 2	Fezes úmidas com pouca sujidade perianal
Escore 3	Fezes úmidas e com bastante sujidade perianal

Fonte: KURITA et al., 2000.

Figura 9. Graus de diarreia de acordo com a intensidade após tratamento com irinotecano em camundongos.



A avaliação da diarreia foi realizada diariamente de acordo com os escores atribuídos relativos à sua intensidade. **Grau 0:** fezes com aspecto normal; **Grau 1:** fezes levemente amolecidas; **Grau 2:** Fezes úmidas com pouca sujidade perianal; **Grau 3:** Fezes úmidas com bastante sujidade perianal. No caso dos animais que morreram em decorrência da diarreia, atribuiu-se o **Grau 4** (KURITA et al., 2000) Figura: LIMA-JUNIOR, 2008.

4.6.4 Contagem total de leucócitos

Os animais foram levemente anestesiados com tribromoetanol (25 mg/kg, i.p.) para coleta de 20 μ L de sangue do plexo retroorbital que foram imediatamente diluídos em 380 μ L de solução de Turk (Ácido acético 2%, Violeta Genciana 0,2%). Em seguida, o número total de leucócitos plasmáticos foi determinado utilizando-se câmara de Neubauer para verificar o efeito da quimioterapia à base de irinotecano na indução da leucopenia. Essa observação serviu como controle da atividade citotóxica do fármaco sobre o animal.

Os resultados da contagem das células contidas nos quatro quadrantes da câmara foram somados e o resultado multiplicado por 20, valor correspondente à diluição realizada e depois por 10, fator de correção para determinar o número de células/mm³.

4.6.5 Análise histopatológica e morfometria do intestino:

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, um segmento de 0,5 cm do íleo foi removido e em seguida lavado com solução salina e formol para posterior fixação em formol tamponado 10% e processamento para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica 100x e 400x (Microscópio Nikon com objetiva 10x ou 40x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x). O íleo foi escolhido por tratar-se da melhor porção intestinal para estudo dos aspectos inflamatórios na mucosite intestinal induzida por irinotecano.

A análise histopatológica consistiu na observação do aspecto das vilosidades e criptas intestinais, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório. O grau e a gravidade da mucosite foram determinados de acordo com uma modificação do sistema de escores proposto por Macpherson & Pfeiffer (1978) e descritos na **tabela 3**.

Tabela 3. Escores histopatológicos para análise de intestino delgado

Escore	Análise histopatológica
0	Ausência de lesão
1	Mucosa: achatamento de vilos e perda de arquitetura das criptas, escassa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema. Camada muscular: normal
2	Mucosa: achatamento de vilos com células entumescidas e com vacúolos, necrose das células da cripta, intensa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema. Camada muscular: normal
3	Mucosa: achatamento de vilos com células entumescidas e vacúolos, necrose da cripta, intensa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema. Camada muscular: edema, vacuolização e infiltração neutrofílica.

Fonte: Macpherson & Pfeiffer (1978).

Para análise morfométrica, objetivou-se obter a medida de vilosidades, considerada desde o ponto de encontro entre duas vilosidades até o topo destas (altura da vilosidade), e

criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre duas vilosidades medidas até o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade absorptiva (razão altura dos vilos/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento dos vilos intestinais e a profundidade das criptas foi calculada em μm utilizando-se o software *ImageJ* versão 1.36b, sendo medidos 10 vilos e 10 criptas por corte histológico, em aumento de 100x.

4.7 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino de camundongos após a indução da mucosite foi determinada pelo ensaio da atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos e utilizada como marcador da infiltração de neutrófilos no tecido inflamado.

Um fragmento de íleo de aproximadamente 1 cm foi coletado de cada animal e incubado em 200 μL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,02 M, NaEDTA 0,015 M; pH 4,7), posteriormente, os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron) e o material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm durante 15 min, a 4°C. Realizou-se um choque hipotônico no sedimento celular (pellet) com 1000 μL de solução de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm/15 min/4°C, o “pellet” foi ressuspensão em tampão NaPO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e homogeneizou-se novamente em triturador Pollytron. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, 4°C e após centrifugação, 50 μL do sobrenadante obtido foi colocado em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, foram adicionados 25 μL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 μL de H₂O₂ (0,5 mM) e a placa foi incubada em estufa por 5 min a 37 °C. A seguir, interrompeu-se a reação com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (com 1×10^5 neutrófilos/50 μL no primeiro poço). Realizou-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm, e os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO *et al*, 2006).

4.8 Dosagem de KC nas amostras de intestino por Ensaio imunoenzimático (ELISA).

As amostras de íleo coletadas foram homogeneizadas e processadas como descrito por Safieh-Garabedian et al. (1995). A detecção de KC foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). Resumidamente, placas para ELISA foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo de captura anti-KC murino (2µg/mL). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 2h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo de detecção durante 2h. Após o período de incubação, lavaram-se as placas e adicionou-se 50 µL do complexo HRP-avidina diluído na proporção 1:200. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50µL) foi adicionado 15min depois e incubaram-se as placas no escuro a 37 C por 15 a 20 min, quando a reação enzimática foi finalizada com H₂SO₄ 2N e a absorbância medida em 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mg de tecido.

4.9 Análise estatística

A análise estatística entre os grupos foi realizada empregando-se o teste de análise de variância (Two-way ANOVA) seguido por pós-teste de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido por teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos. A sobrevida foi analisada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox).

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M (erro padrão da média) para variáveis com distribuição normal, ou pela mediana (mínimo-máximo) no caso de variáveis sem distribuição normal, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o software GraphPad Prism®, versão 6.01.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito imunossupressor do abatacept sobre os parâmetros gerais de indução da mucosite.

No primeiro protocolo, os camundongos foram tratados com irinotecano na dose de 75 mg/kg, via intraperitoneal, durante 4 dias, para indução da mucosite intestinal. Abatacept foi administrado na dose de 10 mg/kg uma hora antes do irinotecano apenas no primeiro dia. Os animais foram pesados diariamente e avaliados quanto ao grau de diarreia e a sobrevida.

A **figura 10** mostra que o irinotecano induziu perda ponderal no decorrer do experimento ($p<0,05$), quando comparamos com o grupo controle negativo tratado apenas com salina, enquanto o pré-tratamento com abatacept não agravou a redução de massa corpórea. Na avaliação da sobrevida, observamos taxa de mortalidade de 100% no grupo tratado com irinotecano em relação ao injetado apenas com salina ($p<0,05$). Além disso, o pré-tratamento com abatacept antecipou a morte dos animais ($p=0,0175$ **Figura 11**). Como observado no teste de sobrevida, ao sétimo dia todos os animais dos grupos tratados com irinotecano haviam morrido, portanto, o quinto dia foi o ideal para realização da eutanásia dos animais.

Irinotecano induziu significativa ($p<0,05$) diarreia de grau moderado no quinto dia experimental, em relação ao controle negativo, e o pré-tratamento com abatacept agravou a diarreia nos camundongos, antecipando seu aparecimento para o quarto dia, com grau moderado (**Figura 12A**) e graus de moderado a grave no quinto dia (**Figura 12B**).

Após a eutanásia, amostras do íleo foram retiradas para as análises morfométricas e histopatológicas, avaliação da atividade de mieloperoxidase e dosagem de citocinas.

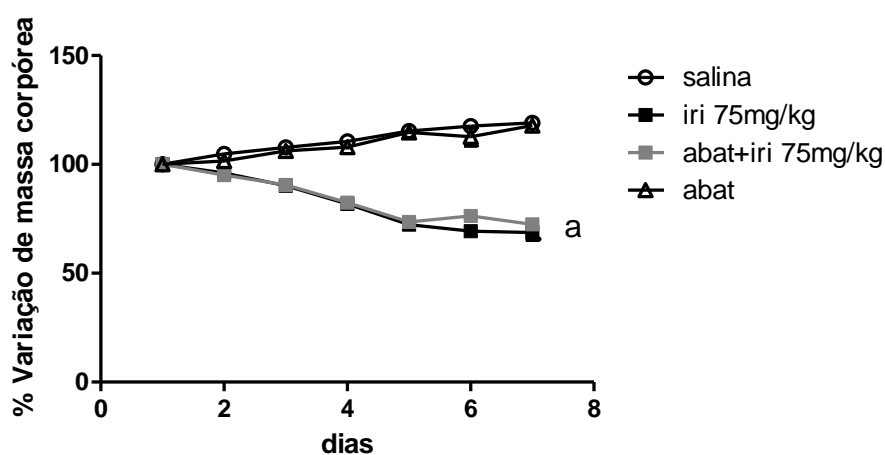
Irinotecano (75 mg/kg) causa considerável dano intestinal nos animais, com redução da altura de vilos, perda da arquitetura das criptas, e o pré-tratamento com abatacept agrava o dano intestinal além de aumentar a infiltração de células inflamatórias na lâmina própria (**Figuras 13A,B e C**). Na avaliação histopatológica através de escores, irinotecano promove lesão intestinal significativa em relação ao grupo tratado apenas com salina, porém o pré-tratamento com abatacept não agrava o dano em relação ao grupo tratado com irinotecano (**Figura 14**). Quando se realizou a análise morfométrica, entretanto, irinotecano na dose de 75 mg/kg causou redução da altura dos vilos, aumento da profundidade das criptas e diminuição da razão vilo/cripta, de forma considerável em relação ao grupo salina ($p<0,05$) e abatacept,

quando associado com irinotecano, promoveu agravo significativo ($p < 0,05$) em todos esses parâmetros (**Figura 15**).

A administração de irinotecano induziu um aumento significativo ($p < 0,05$) do infiltrado de neutrófilos no íleo de camundongos no quinto dia, quando comparamos com o grupo injetado apenas com solução salina. O pré-tratamento com abatacept agravou esse parâmetro em relação ao grupo tratado apenas com irinotecano ($p = 0,0341$ **Figura 16**).

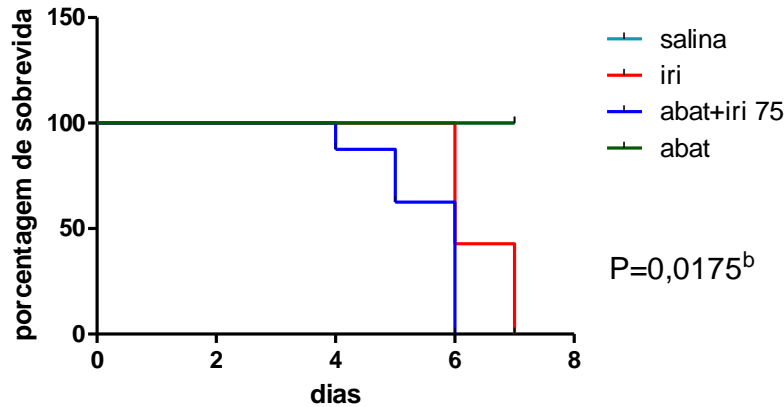
Irinotecano na dose de 75 mg/kg induziu intensa leucopenia nos animais em relação ao grupo injetado com salina ($p < 0,05$), e abatacept não aumentou essa toxicidade nos animais tratados com irinotecano (**Figura 17**). O tratamento com abatacept isoladamente não promoveu alteração em nenhum dos parâmetros avaliados.

Figura 10. Efeito do abatacept sobre a variação de peso dos animais injetados com irinotecano (75 mg/kg) em função do tempo



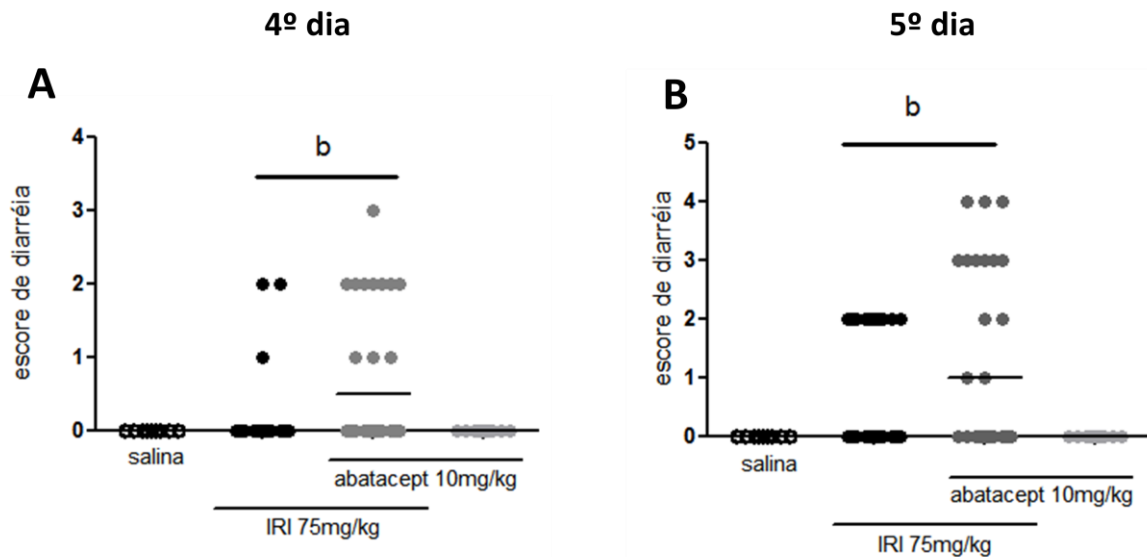
Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Irinotecano induz maior perda de massa corpórea em função do tempo, comparado aos animais tratados com salina. O pré-tratamento com abatacept não agrava a perda. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do percentual de variação da massa corporal em relação ao peso inicial. Para a análise estatística utilizou-se o teste Two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni.

Figura 11. Efeito do abatacept na sobrevivência de animais injetados com irinotecano (75 mg/kg).



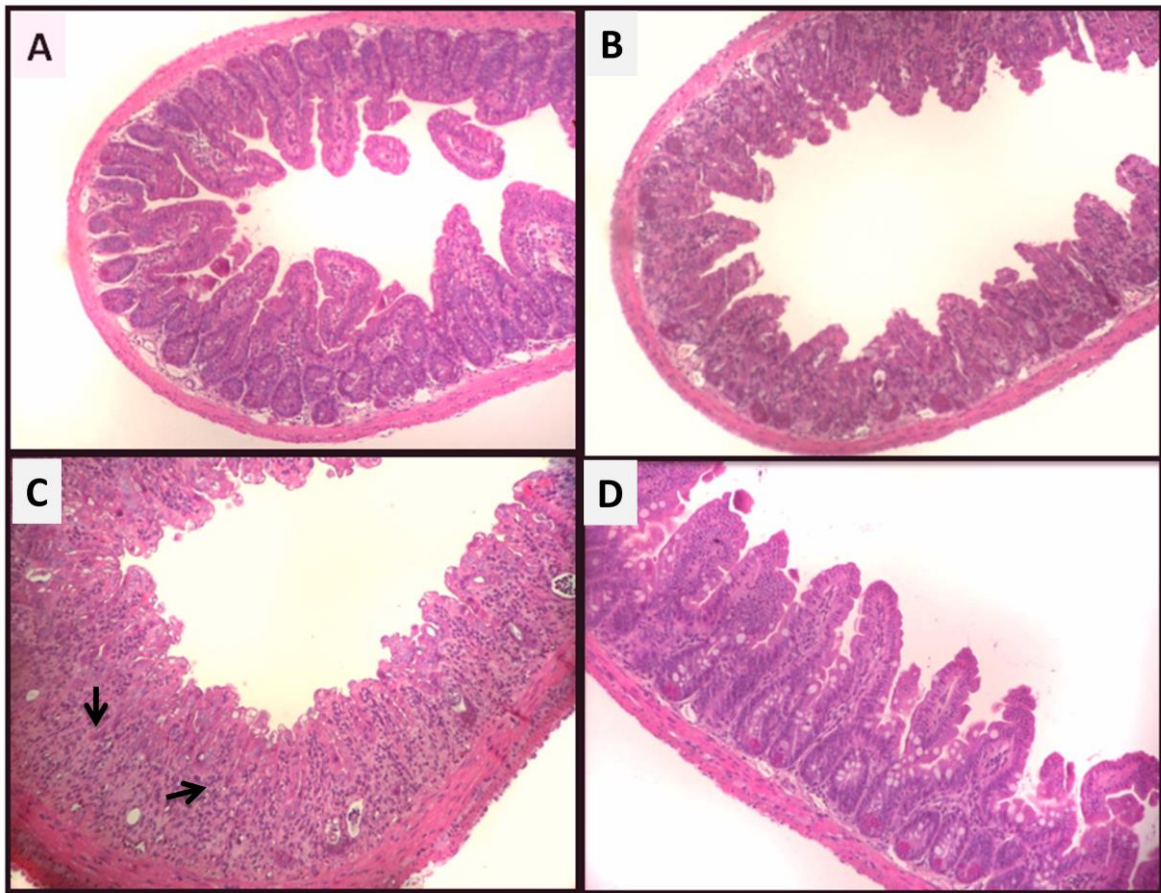
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Abatacept reduziu a sobrevivência dos animais tratados com irinotecano ($p = 0,0175$) com relação aos animais tratados apenas com este antineoplásico. ^b $p < 0,05$ vs grupo injetado apenas com irinotecano. A análise estatística foi realizada pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

Figura 12. Efeito do abatacept sobre os escores de diarreia em camundongos tratados com irinotecano (75 mg/kg).



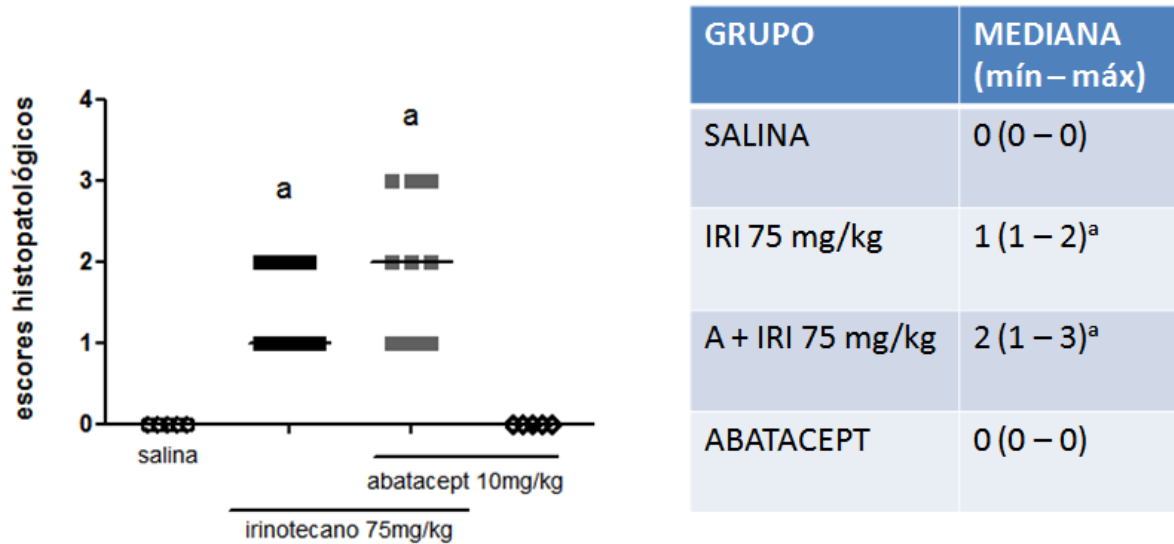
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. A avaliação do grau de diarreia foi realizada diariamente. Irinotecano induz diarreia de grau leve a moderado no quarto (A) e quinto (B) dias, entretanto não houve diferença significativa em relação ao grupo injetado apenas com solução salina. Abatacept agravou a diarreia em animais tratados com irinotecano. ^b $p < 0,05$ vs grupo injetado apenas com irinotecano. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Figura 13. Efeito do abatacept sobre o dano intestinal no íleo dos animais tratados com irinotecano (75 mg/kg).



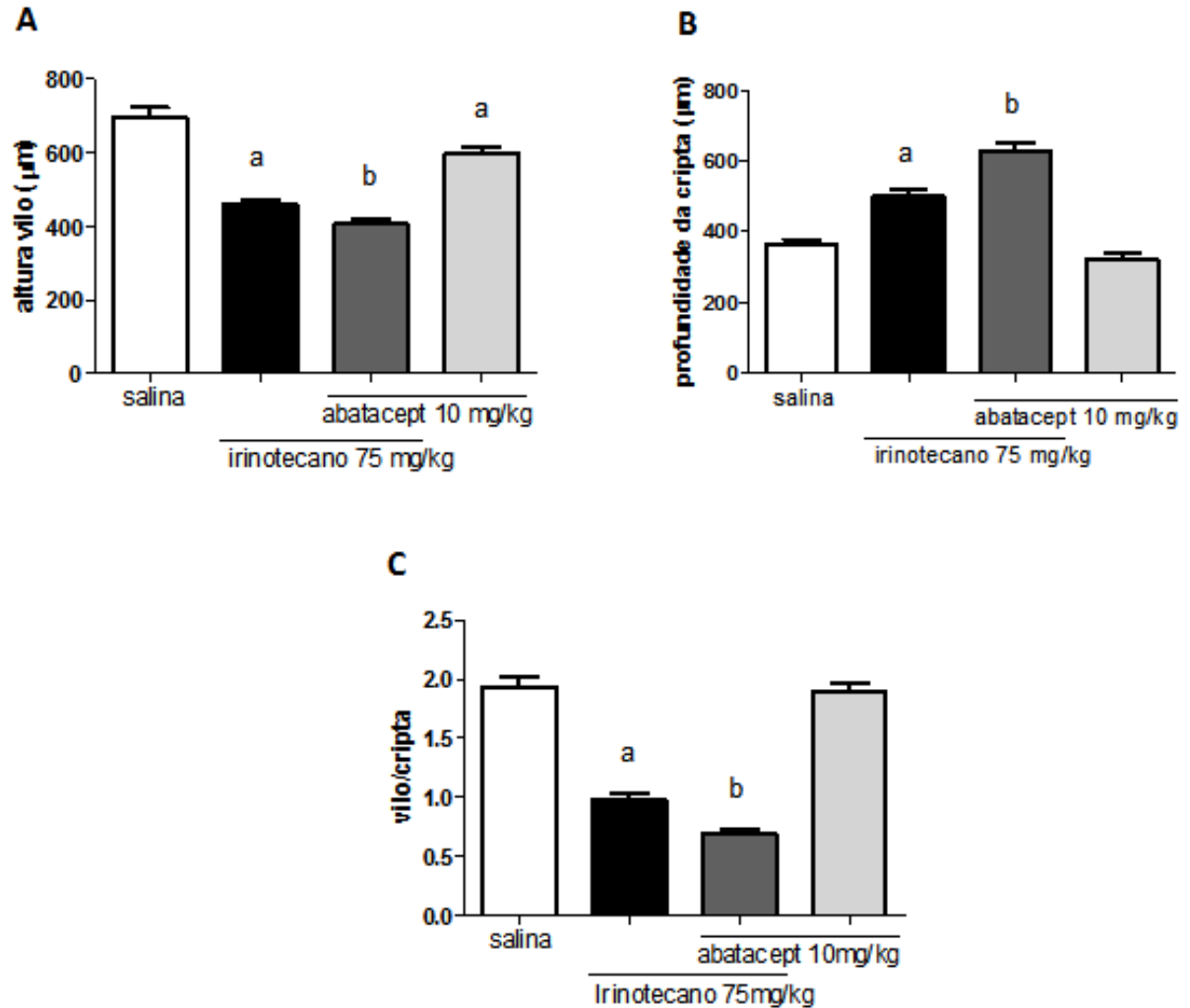
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Após a eutanásia dos animais, segmentos de íleo foram subtraídos para processamento e coloração pelo método H&E. Abatacept, quando associado ao irinotecano, promove dano intestinal intenso com perda da arquitetura da mucosa e intenso infiltrado neutrofílico. **A:** salina; **B:** irinotecano 75 mg/kg; **C:** abatacept + irinotecano 75 mg/kg; **D:** abatacept 10 mg/kg. Setas: células inflamatórias. Aumento: 200x.

Figura 14. Análise histopatológica do efeito do abatacept sobre o fêo dos animais tratados com irinotecano 75 mg/kg



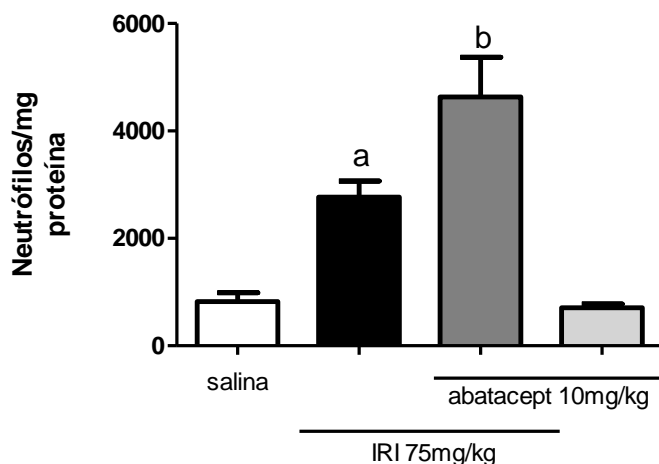
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Após a eutanásia dos animais, segmentos de fêo foram subtraídos para processamento e coloração pelo método H&E para realização da análise histopatológica. Irinotecano na dose de 75 mg/kg induziu lesão intestinal em relação ao grupo tratado apenas com salina, e o pré-tratamento com abatacept não agravou o dano. ^ap<0,05 vs grupo salina. Para a análise estatística utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Figura 15. Efeito do abatacept sobre a análise morfométrica do íleo de animais tratados com irinotecano 75 mg/kg



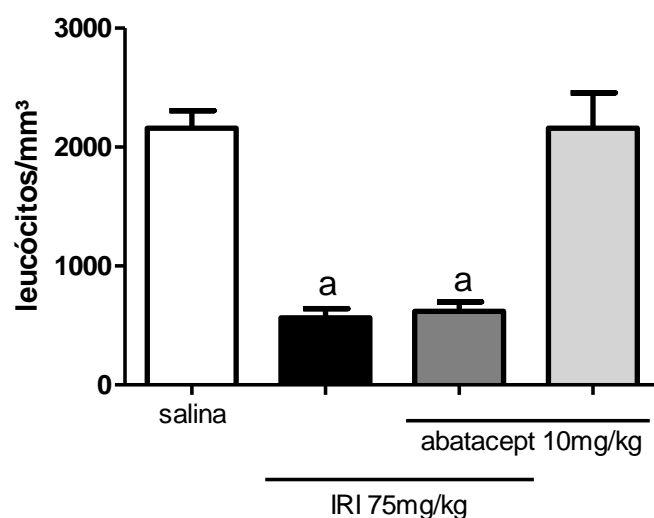
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Após a eutanásia, amostras de íleo foram retiradas para mensuração da altura dos vilos (A), profundidade das criptas (B) e razão vilos/cripta (C). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina; ^b $p < 0,05$ vs grupo injetado apenas com irinotecano. A análise estatística foi realizada por teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

Figura 16. Efeito do abatacept na infiltração de neutrófilos no fígado dos camundongos tratados com irinotecano (75 mg/kg).



Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. A eutanásia foi realizada no quinto dia experimental. Amostras de fígado foram coletadas e o infiltrado neutrofílico determinado indiretamente através do ensaio de mieloperoxidase (MPO). Irinotecano aumentou o infiltrado em relação ao grupo injetado apenas com salina, e o pré-tratamento com abatacept agravou esse parâmetro com relação ao grupo tratado apenas com irinotecano. ^ap<0,05 vs grupo salina e ^bp<0,05 vs grupo irinotecano. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido por Bonferroni.

Figura 17. Efeito do abatacept sobre a contagem total de leucócitos nos animais tratados com irinotecano (75 mg/kg).



Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. A eutanásia foi realizada no quinto dia experimental. Sangue foi coletado do plexo retroorbital dos animais e a contagem dos leucócitos totais foi feita em câmara de Neubauer. Irinotecano provocou leucopenia nos animais, comparado ao grupo salina, e abatacept, quando associado ao irinotecano, demonstrou mielotoxicidade semelhante. O tratamento com abatacept de forma isolada não induziu leucopenia nos animais. ^ap<0,05 vs grupo salina. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Em um segundo protocolo, os animais foram injetados com subdose de irinotecano (45 mg/kg), a qual não induz mucosite intestinal. O intuito desse protocolo foi avaliar se abatacept seria capaz de agravar os parâmetros de indução da mucosite mesmo utilizando-se a subdose.

Os animais foram tratados com irinotecano (45 mg/kg) durante quatro dias, enquanto abatacept foi injetado na dose de 10mg/kg uma hora antes do irinotecano, apenas no primeiro dia. A mesma metodologia anterior foi aplicada, com pesagem diária dos animais, avaliação do grau de diarreia, sobrevida, leucopenia, morfometria e análise histopatológica intestinal. A eutanásia dos animais deu-se no sétimo dia.

A subdose de irinotecano promoveu redução no peso dos animais no decorrer do experimento, em relação aos grupos controle ($p < 0,05$), e não observou-se diferença com relação ao grupo submetido ao pré-tratamento com abatacept (**Figura 18**). Os animais tratados com irinotecano não apresentaram taxa de sobrevida diferente daquela do grupo injetado apenas com salina (ambos 100%). No grupo pré-tratado com abatacept 25% dos animais morreram, porém sem diferença significativa em relação ao grupo injetado apenas com irinotecano (**Figura 19**).

Abatacept agrava a diarreia observada nos animais injetados com irinotecano 45 mg/kg de forma significativa apenas no sétimo dia ($p < 0,05$), enquanto a subdose de irinotecano sozinha não foi capaz de induzir diarreia considerável (**Figura 20A, B, C e D**).

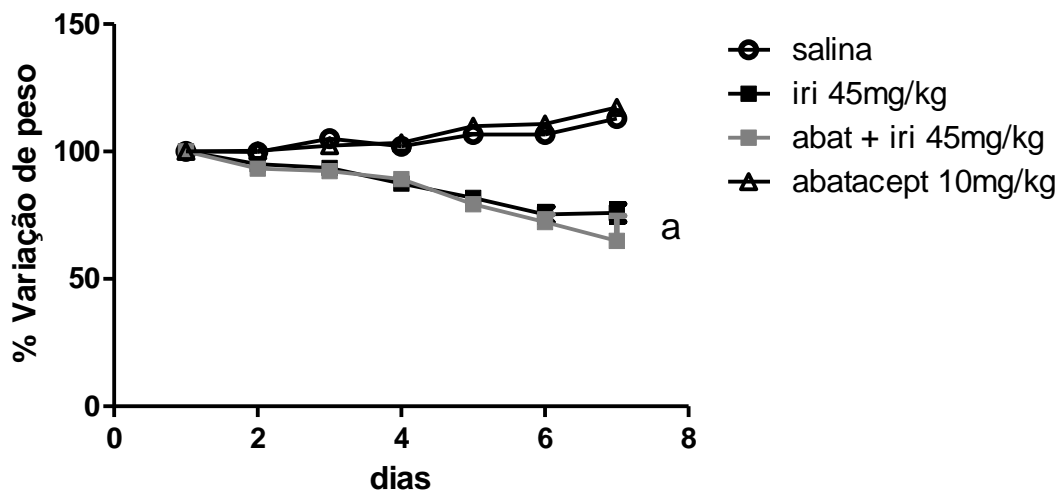
Após a eutanásia, amostras do íleo foram retiradas para as análises morfométricas e histopatológicas, avaliação da atividade de mieloperoxidase e dosagem de citocinas.

Os animais tratados com subdose de irinotecano apresentaram leve alteração da arquitetura intestinal em relação ao grupo salina ($p < 0,05$), e o pré-tratamento com abatacept aumentou a infiltração de células inflamatórias e vacuolização (**Figura 21**). A análise histológica baseada em escores demonstrou que a subdose causa dano de baixa magnitude quando comparado com o grupo controle tratado apenas com solução salina ($p < 0,05$) (**Figura 22**). Quando realizou-se a análise morfométrica, observou-se que a subdose de irinotecano reduziu a altura dos vilos e a razão vilo/cripta, entretanto não causou aumento na profundidade das criptas. De forma semelhante, o pré-tratamento com abatacept promoveu redução considerável apenas nesses dois parâmetros, relação ao grupo tratado apenas com irinotecano (**Figuras 23**).

Abatacept agravou a infiltração de neutrófilos no intestino dos animais tratados com irinotecano, em comparação ao grupo injetado apenas com esse fármaco ($p < 0,05$), **Figura 24**. Apesar desta dose de irinotecano não ser capaz de reproduzir a mucosite intestinal

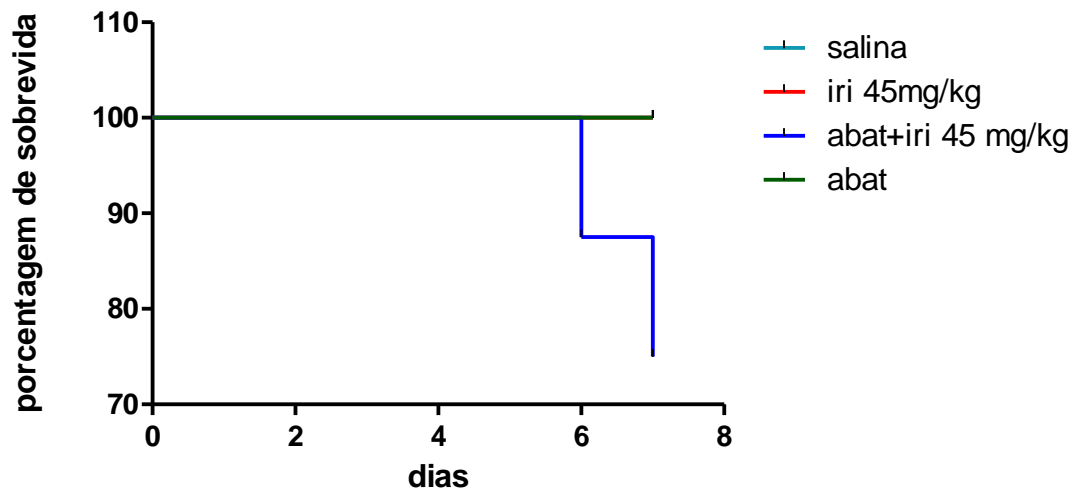
em todos os seus parâmetros inflamatórios, uma redução no número de leucócitos totais foi observada nestes animais (**Figura 25**). O tratamento com abatacept de forma isolada não provocou alterações em nenhum desses parâmetros.

Figura 18. Efeito do abatacept na variação de massa corpórea de animais tratados com irinotecano 45 mg/kg



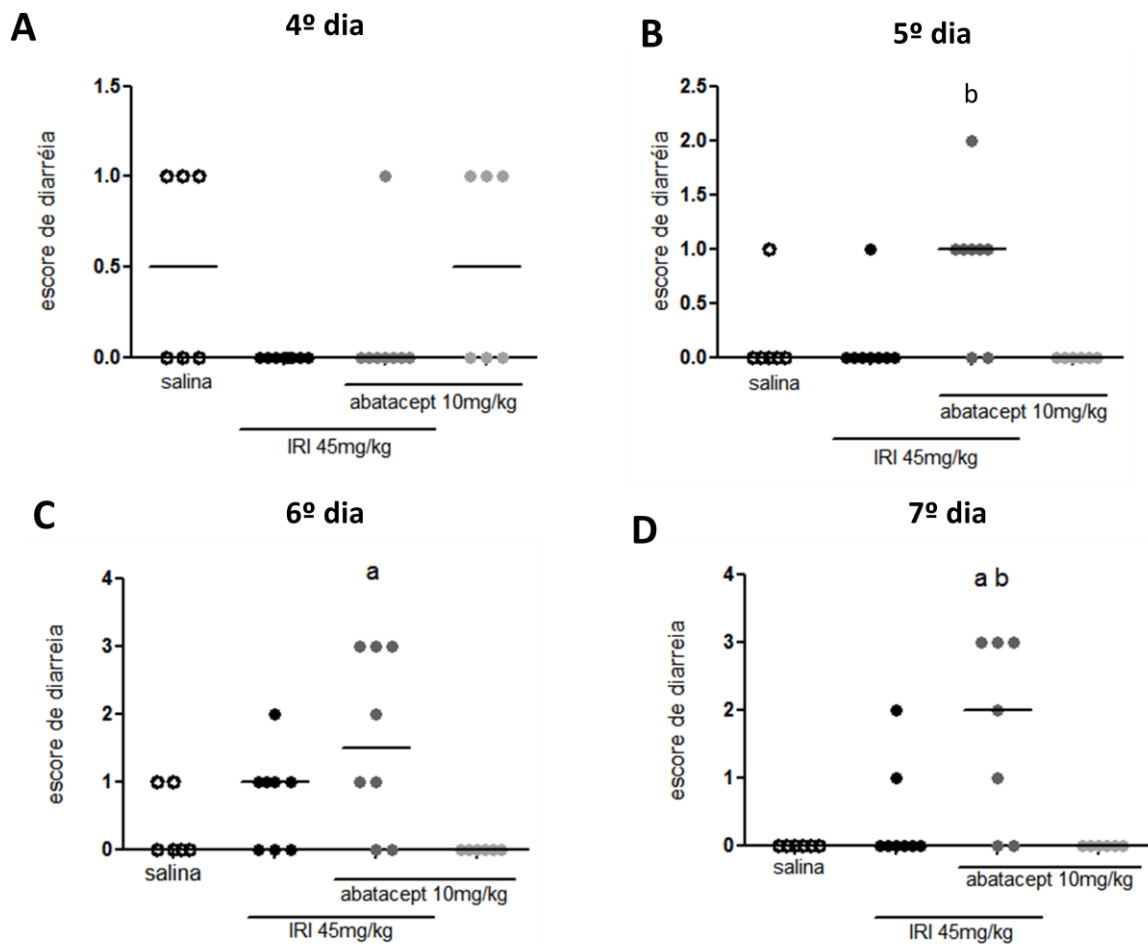
Os camundongos foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias) ou irinotecano (45 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), ou pré-tratados com abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Irinotecano na dose de 45 mg/kg induziu maior perda de massa corpórea em função do tempo, comparado aos animais tratados com salina. O pré-tratamento com abatacept não agrava a perda. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. Os pontos representam a média \pm E.P.M. do percentual de variação da massa corporal em relação ao peso inicial. Para a análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni

Figura 19. Efeito do abatacept sobre a sobrevida dos camundongos tratados com subdose de irinotecano



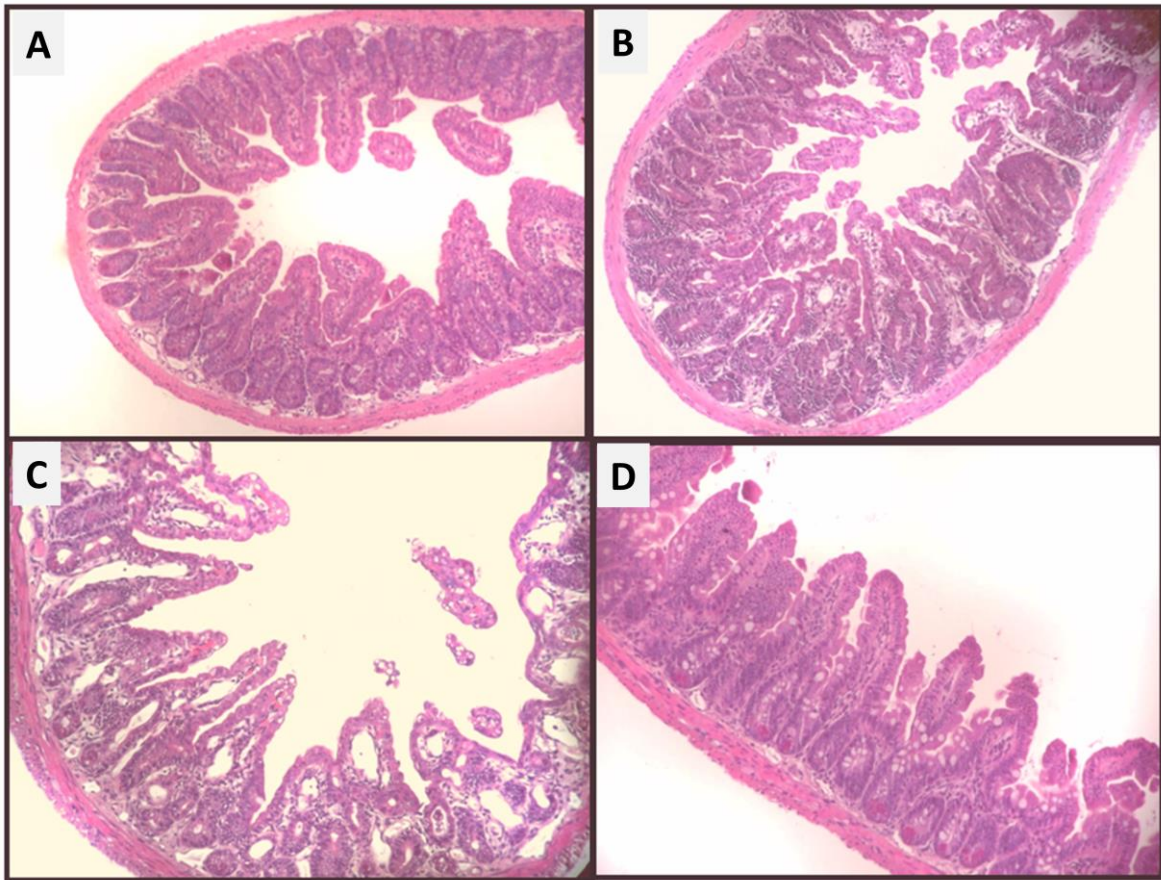
Os camundongos foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias) ou irinotecano (45 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), ou pré-tratados com abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. O pré-tratamento com abatacept antecipou a morte dos animais, porém sem diferença significativa em relação ao grupo tratado com irinotecano isoladamente ($p > 0,05$). A análise estatística foi realizada pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

Figura 20. Efeito do abatacept na diarreia em camundongos injetados com subdose de irinotecano



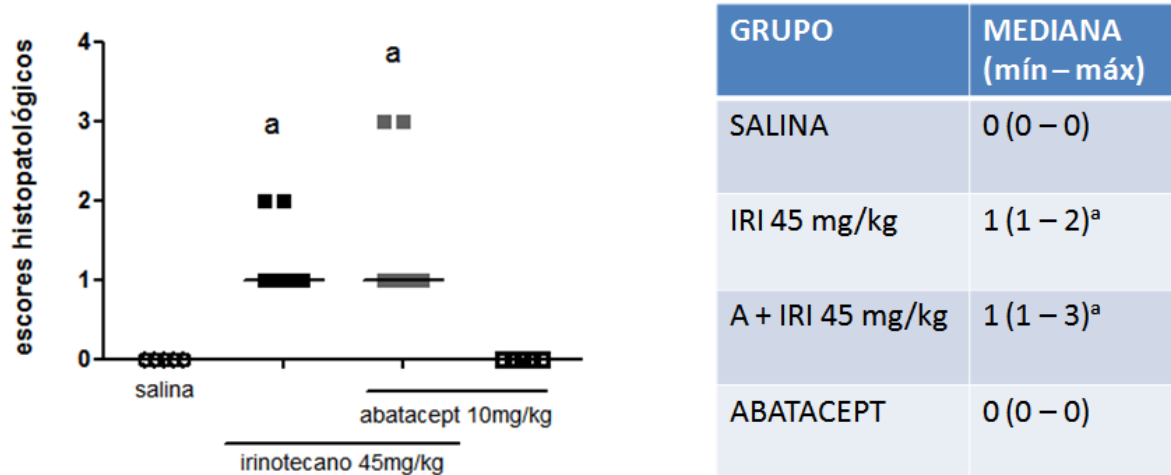
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias) ou irinotecano (45 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), ou pré-tratados com abatacept (10 mg/kg i.p. 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Os animais foram analisados diariamente em relação aos escores de diarreia no quarto (A), quinto (B), sexto (C) e sétimo (D) dias após o primeiro dia experimental. A subdose de irinotecano não foi capaz de induzir diarreia nos animais, em relação ao grupo salina. O pré-tratamento com abatacept induziu o aparecimento de diarreia considerável já no quinto dia com relação ao grupo controle, e agravou esse parâmetro no sétimo dia, em relação ao grupo tratado com irinotecano. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. ^b $p < 0,05$ vs grupo irinotecano. Para a análise utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Figura 21. Efeito do abatacept no íleo de animais tratados com subdose de irinotecano



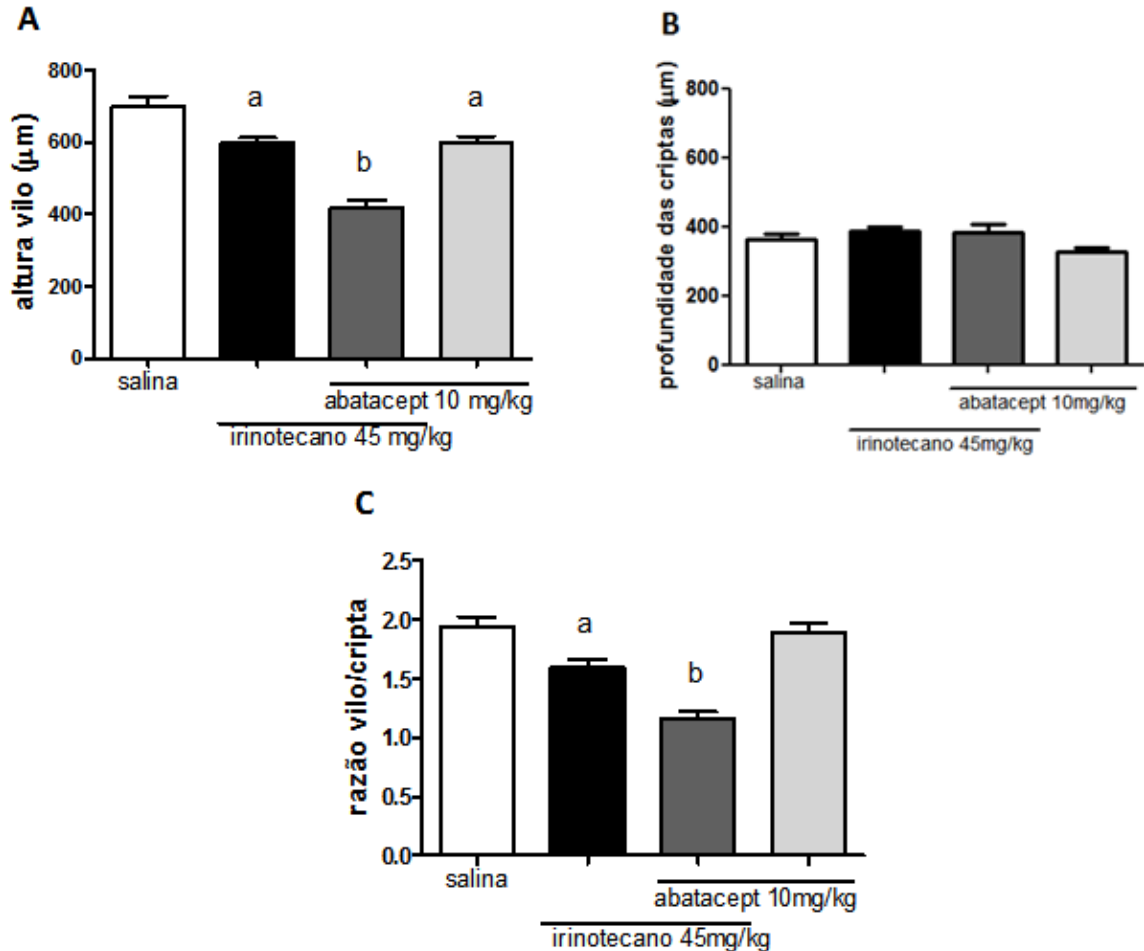
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (45 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Os animais foram eutanasiados no sétimo dia experimental, e após a eutanásia, segmentos de íleo foram subtraídos para processamento e coloração pelo método H&E. O pré-tratamento com abatacept levou à formação de edema e desestruturação da arquitetura intestinal na região do íleo. **A:** salina; **B:** irinotecano 45 mg/kg; **C:** abatacept + irinotecano 45 mg/kg; **D:** abatacept 10 mg/kg. Aumento: 100x.

Figura 22. Análise histopatológica do efeito do abatacept sobre o íleo dos animais tratados com subdose de irinotecano



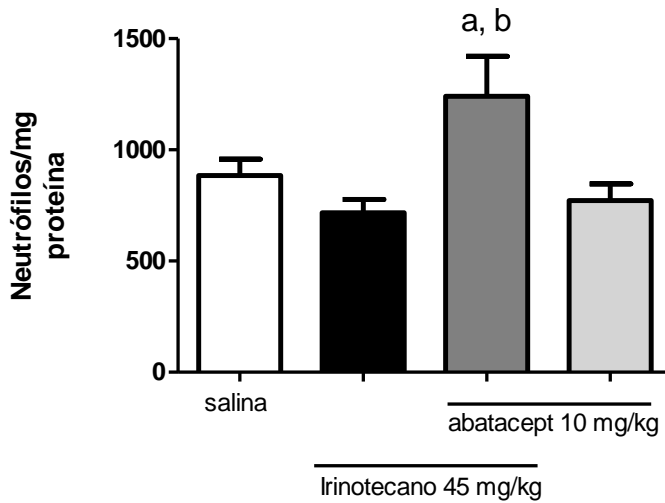
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1xdia/4 dias), irinotecano (45 mg/kg i.p. 1xdia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. . Após a eutanásia dos animais, segmentos de íleo foram subtraídos para processamento e coloração pelo método H&E para realização da análise histopatológica. A subdose de irinotecano induziu lesão intestinal em relação ao grupo tratado apenas com salina, e o pré-tratamento com abatacept não agravou o dano com relação ao grupo tratado apenas com irinotecano. ^ap<0,05 vs grupo salina. Para a análise estatística utilizou-se o teste de Kruskal-wallis seguido por pós-teste de Dunn.

Figura 23. Efeito do abatacept sobre a morfometria do íleo de animais tratados com subdose de irinotecano



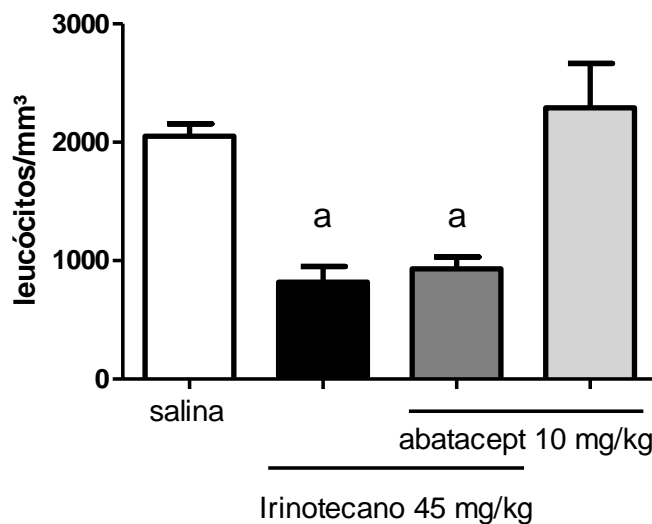
Os animais foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (45 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. Após a eutanásia, amostras de íleo foram retiradas para mensuração da altura dos vilos (A), profundidade das criptas (B) e razão vilos/cripta (C). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina; ^b $p < 0,05$ vs grupo injetado apenas com irinotecano. A análise estatística foi realizada por teste ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni.

Figura 24. Efeito do abatacept na infiltração de neutrófilos no fígado dos camundongos tratados com subdose de irinotecano



Os camundongos foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), ou pré-tratados com abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. A subdose de irinotecano não foi capaz de aumentar o infiltrado neutrofilico no fígado, quando comparamos com o grupo salina ($p > 0,05$). O pré-tratamento com abatacept, no entanto, agravou o infiltrado, em relação ao grupo tratado apenas com irinotecano e grupo salina. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. ^b $p < 0,05$ vs grupo irinotecano. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido por Bonferroni.

Figura 25. Efeito do abatacept sobre a contagem total de leucócitos em animais tratados com subdose de irinotecano

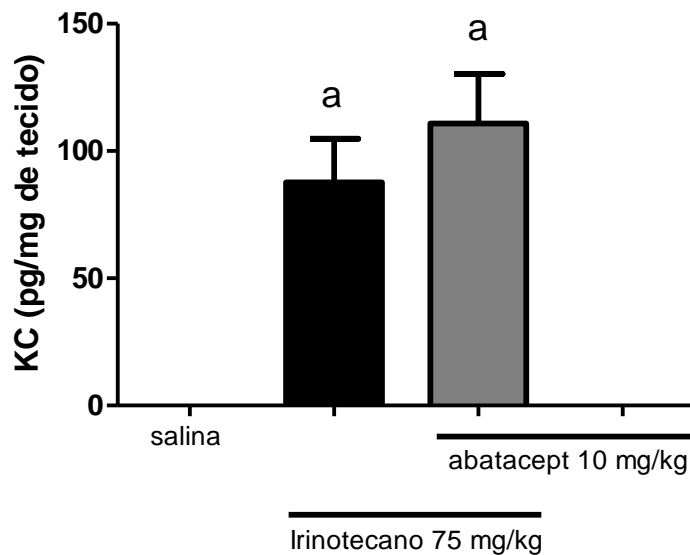


Os camundongos foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), ou pré-tratados com abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. A subdose de irinotecano reduziu o número total de leucócitos no sangue periférico de forma significativa em relação ao grupo injetado apenas com salina. O pré-tratamento com abatacept não agravou a mielotoxicidade e abatacept isoladamente não causa redução no número total de leucócitos. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. A análise estatística foi realizada por teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

5.2 Dosagem do nível KC nas amostras de íleo por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os animais foram eutanasiados no quinto dia experimental no protocolo I (irinotecano na dose de 75 mg/kg) e amostras do íleo foram retiradas e armazenadas a -80°C para posterior dosagem de citocinas. Irinotecano aumentou significativamente o nível de KC no íleo dos animais tratados, quando comparamos com o grupo controle injetado apenas com salina ($p < 0,05$). O pré-tratamento com abatacept não promoveu aumento significativo no nível desta citocina, em relação ao grupo tratado apenas com irinotecano (**Figura 24**).

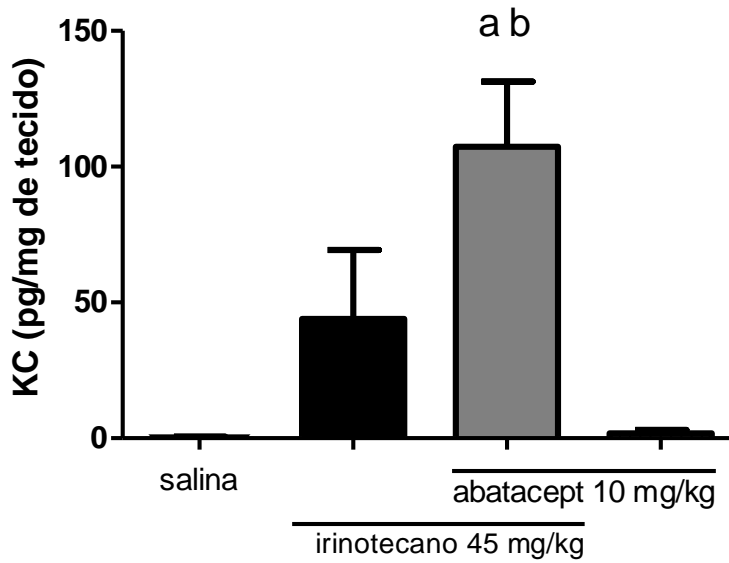
Figura 26. Efeito do abatacept no nível de KC no íleo de camundongos tratados com irinotecano 75 mg/kg.



Os animais receberam salina 0,9% (5 mL/kg i.p. 1x/dia/4 dias), irinotecano (75 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. A eutanásia foi realizada no quinto dia experimental. Irinotecano aumentou o nível de KC no intestino dos animais em relação ao grupo tratado com salina. O pré-tratamento com abatacept não promoveu aumento significativo com relação ao grupo tratado com irinotecano separadamente. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. A análise estatística foi realizada por teste ANOVA e pós-teste Bonferroni.

No protocolo II a eutanásia dos animais aconteceu no sétimo dia experimental. A retirada e o processamento das amostras deu-se da mesma forma que no protocolo I. A subdose de irinotecano induziu aumento no nível de KC no íleo dos animais (**Figura 25**), com relação ao grupo salina, e o pré-tratamento com abatacept agravou consideravelmente esse parâmetro ($p < 0,05$).

Figura 27. Efeito do abatacept no nível de KC no íleo de camundongos tratados com subdose de irinotecano.



Os camundongos foram tratados com salina 0,9% (5 mL/kg i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg i.p. 1x/dia/4 dias), ou pré-tratados com abatacept (10 mg/kg i.p.) 1h antes do irinotecano no primeiro dia, ou abatacept (10 mg/kg i.p. no primeiro dia) isoladamente. A subdose de irinotecano induziu aumento no nível de KC no íleo dos animais, quando comparamos com o grupo injetado somente com salina. Abatacept quando injetado antes do irinotecano promoveu aumento no nível desta citocina em relação ao grupo salina e também irinotecano. O tratamento com abatacept isoladamente não provocou aumento nos níveis dessa citocina. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina. ^b $p < 0,05$ vs grupo irinotecano. A análise foi realizada pelo teste ANOVA seguido por Bonferroni.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos examinar o efeito da imunossupressão com abatacept no desenvolvimento e progressão da mucosite intestinal induzida por irinotecano, em modelo experimental utilizando camundongos swiss. Nossos resultados mostraram um efeito deletério do pré-tratamento com este anticorpo no curso da mucosite, com agravamento de praticamente todos os parâmetros avaliados, como infiltrado neutrofílico, diarreia, aumento do nível de KC e dano intestinal acentuado, ocasionando, como consequência desses fatores, redução da sobrevivência.

Com o crescente interesse na investigação dos mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano, modelos experimentais animais foram desenvolvidos, reproduzindo da melhor forma possível os sintomas observados na clínica. Em alguns protocolos experimentais utilizando ratos, uma única injeção endovenosa de irinotecano na dose de 200 mg/kg é capaz de promover o desenvolvimento de mucosite intestinal, determinada pelos níveis de diarreia e histologia e apresentando baixa taxa de mortalidade. Já no modelo de Ikuno *et al.* (1995), induziu-se mucosite intestinal pela administração de irinotecano na dose de 100mg/kg durante quatro dias consecutivos (GIBSON *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2008).

O modelo de indução de mucosite intestinal utilizado neste trabalho foi proposto por Melo e colaboradores, (2008) e consiste em uma modificação do protocolo proposto por Ikuno *et al.* (1995). Melo *et al.* (2008) demonstrou que camundongos tratados com irinotecano na dose de 75 mg/kg, administrado via intraperitoneal durante quatro dias consecutivos apresentaram lesão intestinal característica de MI, além de diarreia e aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e KC.

Para o pré-tratamento com abatacept, utilizou-se a dose de 10mg/kg, sendo esta a dose utilizada na clínica e nos modelos animais de artrite reumatóide onde observou-se redução significativa de citocinas pró-inflamatórias utilizando esse anticorpo (WEISMAN *et al.*, 2006; KÖLLER, 2007; PLATT *et al.*, 2010; PATAKAS *et al.*, 2016).

Lima-Junior (2008) demonstrou que a dose de 45mg/kg de irinotecano, apesar de mielotóxica, era incapaz de reproduzir mucosite intestinal em camundongos swiss. O tratamento dos animais com essa dose não induziu diarreia ou danos histopatológicos significativos, o que foi determinado pelos escores histopatológicos (LIMA-JUNIOR, 2008). A utilização desta dose no nosso estudo buscou averiguar se abatacept seria capaz de agravar

os parâmetros inflamatórios quando em combinação com uma dose incapaz de gerar dano intestinal. A eutanásia neste protocolo foi realizada no sétimo dia, já que a sobrevivência dos animais foi consideravelmente maior.

O modelo descrito por Melo *et al.* (2008) apresenta baixa taxa de mortalidade, sendo a eutanásia realizada no sétimo dia experimental após o início do tratamento. No nosso estudo, entretanto, a eutanásia dos animais foi feita no quinto dia para o protocolo I, devido à alta taxa de mortalidade observada nos sexto e sétimo dias, principalmente no grupo tratado com abatacept.

Pacientes submetidos à terapia antineoplásica normalmente apresentam intensa perda de massa corpórea. A perda de peso associada à má-nutrição aumenta o risco de infecções e os gastos com saúde, reduz a qualidade de vida, afeta a resposta ao tratamento quimioterápico e reduz a sobrevivência (SÁNCHEZ-LARA *et al.*, 2013). Estudos prévios do nosso grupo mostram que animais submetidos a tratamento com irinotecano apresentam uma perda de peso considerável, principalmente devido à intensa diarreia, mas também devido à redução da superfície absorptiva do intestino e aumento da motilidade (MELO, 2007; LIMA-JUNIOR, 2008; WONG, 2013). O tratamento com abatacept em animais não está relacionado com perda de massa corpórea, assim como observamos neste trabalho (BIGBEE *et al.*, 2007; ALI *et al.*, 2015).

Diarreia tardia (não-colinérgica) é o principal evento observado nos pacientes como consequência da terapia com irinotecano. Diversos estudos têm buscado explicar os mecanismos que levam ao desenvolvimento desta. Nossos resultados corroboram com Lima-Júnior (2008), o qual observou diarreia precoce no quinto dia experimental com irinotecano nas doses de 60 e 75 mg/kg, em modelo animal utilizando camundongos C57BL/6. Melo e colaboradores (2008), em protocolo utilizando camundongos swiss tratados com irinotecano na dose de 75 mg/kg observaram diarreia severa no sexto dia experimental.

Evidenciamos que animais tratados com abatacept uma hora antes do irinotecano na dose de 75 mg/kg apresentaram diarreia severa já no quinto dia experimental, e no segundo protocolo, abatacept induziu desenvolvimento de diarreia de grau moderado no sexto dia, comprovando o papel deletério deste, já que Lima-Junior (2008), assim como no nosso estudo, não observou diarreia em animais tratados apenas com subdose de irinotecano.

O desenvolvimento da diarreia e da mucosite parece ocorrer de forma independente, pois a modulação com talidomida, por exemplo, capaz de aumentar a degradação do mRNA de TNF- α , reduz os parâmetros inflamatórios mas não representa

nenhuma proteção contra o desenvolvimento de diarreia em camundongos (MELO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2016). De forma semelhante, estudos mostram que abatacept comprovadamente reduz os níveis de TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-17 em modelos animais de artrite, porém no nosso estudo essa inibição não protegeu contra o desenvolvimento de diarreia (KO *et al.*, 2010; PLATT *et al.*, 2010; KÖRMENDY *et al.*, 2013).

O dano à mucosa oral e do trato gastrointestinal (TGI) é um efeito adverso bastante comum observado em pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos. Esse dano à mucosa caracteriza a mucosite do trato alimentar, a qual tem como sintomas clássicos dor e ulceração, náuseas, vômitos, constipação e diarreia (GIBSON *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2008). Como demonstrado anteriormente nos resultados, irinotecano causou dano à mucosa intestinal, o qual foi mais significativo quando se utilizou a dose de 75 mg/kg, e o pré-tratamento com abatacept agravou as alterações funcionais e lesão à mucosa do íleo, inclusive nos animais tratados com subdose de irinotecano, como observamos na análise morfológica (quantitativa) e estes eventos que foram associados com o grau de diarreia observados.

Na patogênese da MI, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) estimulam TLRs a ativarem MyD88 e NF κ B que por sua vez ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias da família da IL-1, como IL-1 β , IL-18 e IL-33. Estas citocinas contribuem para a produção de quimiocinas, levando ao recrutamento de neutrófilos, e induzem as células residentes intestinais a expressarem COX-2 e iNOS, promovendo a produção de prostaglandinas e óxido nítrico, o que agrava o dano à mucosa possivelmente pela ação de radicais como peroxinitrito (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Uma maneira indireta para avaliar a presença de neutrófilos na lâmina própria intestinal é a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase, presente nos grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares (BRADLEY *et al.*, 1982). O pré-tratamento com abatacept elevou a atividade dessa enzima inclusive nos animais tratados com a subdose Irinotecano.

O modelo experimental reproduziu de maneira satisfatória os resultados encontrados nos diversos trabalhos do nosso grupo (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2015) e também de outros pesquisadores (IKUNO *et al.*, 1995; GIBSON *et al.*, 2003, LOGAN *et al.*, 2008).

Trabalhos do nosso grupo demonstram que a resposta inflamatória decorrente do tratamento quimioterápico com irinotecano é mais pronunciada no íleo que nos outros seguimentos intestinais, como por exemplo, a infiltração de neutrófilos, a qual é mais bem

evidenciada nessa porção no quinto e principalmente no sétimo dia, em comparação com o jejuno (WONG, 2013), sendo esta a razão da escolha do íleo como porção intestinal para se avaliar os parâmetros inflamatórios e dano intestinal nos animais nesse trabalho.

O perfil de citocinas inflamatórias envolvidas na patogênese da mucosite intestinal sugere a participação predominante de um perfil pró-inflamatório, com participação de células da imunidade inata e linfócitos Th1 e Th2. Outro tipo de células T, as células T regulatórias (Treg), foram mais recentemente descobertas, e apresentam atividade imunossupressora com indução de um perfil de citocinas diferentes daquelas secretadas por linfócitos Th1 e Th2. As proporções relativas dessas subpopulações induzidas durante uma resposta imune são os principais fatores determinantes das conseqüências patológicas dessa resposta. Quando um dos dois perfis, o pró ou o anti-inflamatório, predomina durante o desenvolvimento de uma resposta imune, esta torna-se cada vez mais polarizada na direção desta (MCGUIRK & MILLS, 2002 apud LIMA-JUNIOR, 2008).

O tratamento com irinotecano ocasiona aumento na frequência de células T regulatórias e Th17 na lâmina própria intestinal, no quinto e principalmente no sétimo dia, e a depleção de Tregs com ciclofosfamida reduziu a sobrevivência e agravou a perda de massa corpórea, diarreia e infiltração de neutrófilos, demonstrando a importância do equilíbrio entre perfil pró e anti-inflamatório na patogênese da MI induzida por irinotecano (dados não publicados).

Pouco se sabe sobre o efeito do abatacept sobre linfócitos T regulatórios. Enquanto alguns estudos mostram depleção destas células (RIELLA *et al.*, 2012; NAKAMURA *et al.*, 2014), outros autores observaram aumento na frequência deste subtipo linfocitário (KO *et al.*, 2010; BONELLI *et al.*, 2015). Adicionalmente, Álvarez-Quiroga e colaboradores (2011) demonstraram que abatacept reduz a frequência de Tregs mas aumenta a sua atividade. Ainda, Ahmadi *et al.* (2014) observaram que abatacept mantém a capacidade proliferativa de Tregs inalterada *in vitro*. Não se sabe, portanto, se o efeito deletério de abatacept tem relação com a depleção de células Treg, que como ciclofosfamida levaria ao agravamento da mucosite.

Como descrito anteriormente, a patogênese da MI induzida por irinotecano em animais envolve a participação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, e KC, sendo esta última citocina análoga à IL-8 nos camundongos (LOGAN *et al.*, 2008; MELO *et al.*, 2008). As citocinas primárias, TNF- α , IL-1, produzidas por macrófagos residentes em resposta a patógenos estimulam as células endoteliais a expressarem as moléculas de adesão E e P-selectinas, promovendo o rolamento de neutrófilos. Ainda em resposta a estas mesmas

citocinas, macrófagos e células endoteliais produzem quimiocinas, como IL-8, que atraem os neutrófilos para o local da inflamação e aumentam a expressão de moléculas de adesão protéicas denominadas ICAMs na superfície do endotélio, as quais se ligam às integrinas na membrana celular dos neutrófilos, promovendo sua adesão e extravasamento para o foco inflamatório (ABBAS, LICHTMAN, 2007).

Como observado no nosso estudo, o tratamento com irinotecano aumentou o nível de KC no íleo de camundongos apenas na dose de 75 mg/kg. De forma interessante, o pré-tratamento com abatacept aumentou de forma considerável os níveis dessa citocina em relação ao grupo tratado com irinotecano na dose de 45 mg/kg, a qual não havia induzido aumento nessa citocina. Este resultado corrobora com os achados no ensaio de mieloperoxidase, onde observamos aumento no infiltrado de neutrófilos nesses animais.

O reconhecimento de patógenos pelos macrófagos e neutrófilos se dá através de receptores Toll-like (TLR), específicos para estruturas frequentemente presentes nas moléculas microbianas. Os TLR2 são responsáveis pela resposta dos macrófagos a lipoglicanos bacterianos, TLR4 para lipopolissacarídeo bacteriano, TLR5 para flagelina e TLR9 para nucleotídeos CpG não-metilados das bactérias (ABBAS, LICHTMAN, 2007). Estudos mostram a ocorrência de mudanças quali e quantitativas na microbiota intestinal relacionadas com o tratamento com irinotecano, mudanças estas que apresentam papel significativo no desenvolvimento e severidade da mucosite intestinal, principalmente durante septicemia, através da ativação de receptores Toll-like, que levam à amplificação da resposta inflamatória e, portanto, do dano intestinal (BRANDI *et al.*, 2006; STRINGER *et al.*, 2007; WONG *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Associado à mudança na microbiota intestinal e aumento do número de bactérias, o dano à barreira constituída pela mucosa intestinal leva à translocação bacteriana para a circulação sistêmica, podendo ocasionar o desenvolvimento de mucosite oral, aumentar o risco de infecções e hospitalizações em decorrência desta, e provocar diarreia (BRANDI *et al.*, 2006; SONIS, 2007; STRINGER *et al.*, 2013).

Os microorganismos intracelulares fagocitados por macrófagos e células dendríticas são eliminados pela imunidade celular mediada pelos linfócitos T. Estas células apresentam os antígenos provenientes destes microorganismos às células Th virgens nos órgãos linfóides e promovem a ativação e proliferação destes a linfócitos Th1 ou Th2. As células Th1 estão relacionadas com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é efetiva contra helmintos e bactérias extracelulares (MILLS, MCGUIRK, 2004).

Linfócitos T apresentam papel regulatório da atividade citotóxica e fagocítica de células da resposta imune inata, onde Th1 produzem IFN- γ , o qual estimula a atividade microbicida de macrófagos, induz a expressão de MHC I e MHC II, ativa linfócitos T citotóxicos e células natural killer (MONSERRAT *et al.*, 2012; GIZINSKI, FOX, 2014). Abatacept, por inibir a ativação de linfócitos T reduz os níveis de IFN- γ (PLATT *et al.*, 2010; KORMENDY *et al.*, 2013). Esta redução pode prejudicar, desta forma, o clearance bacteriano.

A importância da resposta imune adaptativa é reconhecidamente necessária para a eliminação de patógenos como vírus, protozoários e bactérias e sabe-se, por exemplo, que a sepse está relacionada a níveis reduzidos de linfócitos Th no sangue periférico de pacientes, assim como do nível de citocinas relacionadas a estas células (CHEADLE *et al.*, 1993; LE TULZO *et al.*, 2002; CHEN, YE, 2011, CABRERA-PEREZ *et al.*, 2014). Abatacept parece contribuir para a eliminação ineficaz dos patógenos, e isto associado ao dano à mucosa intestinal aumenta o risco de translocação bacteriana, levando à morte dos animais provavelmente por sepse.

Para a comprovação do efeito imunossupressor de abatacept, se faz necessária a caracterização do perfil linfocitário no intestino destes animais, além da dosagem de citocinas que acreditem nossa hipótese, o que será realizado em experimentos futuros. Este trabalho veio agregar um dado a mais no entendimento da complexa etiologia da mucosite intestinal induzida por irinotecano, principalmente se considerarmos que a literatura não apresenta ainda dados consistentes sobre a participação de linfócitos nesta patogênese. Os resultados apresentados aqui fornecem uma base para estudos mais aprofundados, de forma a identificar o mecanismo pelo qual a imunossupressão agrava os parâmetros avaliados.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse trabalho, podemos concluir que abatacept, quando associado ao irinotecano, promove agravo da toxicidade intestinal, aumentando a resposta inflamatória e o dano tecidual associados à mucosite induzida pelo tratamento quimioterápico à base de irinotecano.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. *Imunologia Básica*. Ed Elsevier, 2ª edição, p. 29-30, Rio de Janeiro, 2007.
- ABRAMS, J. R.; LEBWOHL, M. G.; GUZZO, C. A.; JEGASOTHY, B. V.; GOLDFARB, M. T.; GOFFE, B. S.; WEINER, R. S. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. **The Journal of clinical investigation**. v. 103(9), p. 1243-1252, 1999.
- AHMADI, S. M.; HÖLZL, M. A.; MAYER, E.; WEKERLE, T.; HEITGER, A. CTLA4-Ig preserves thymus-derived T regulatory cells. **Transplantation**. v. 98(11), p. 1158-1164, 2014.
- ALI, A.; WELIN, A.; SCHWARZE, J. C.; SVENSSON, M. N.; NA, M.; JARNEBORN, A.; BYLUND, J. CTLA4 Immunoglobulin but Not Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy Promotes Staphylococcal Septic Arthritis in Mice. **Journal of Infectious Diseases**. v. 212(8), p. 1308-1316, 2015.
- ÁLVAREZ-QUIROGA, C.; ABUD-MENDOZA, C.; DONÍZ-PADILLA, L.; JUÁREZ-REYES, A.; MONSIVÁIS-URENDA, A.; BARANDA, L.; GONZÁLEZ-AMARO, R. CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. **J Clin Immunol**. v. 31(4), p. 588-95, 2011.
- 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**. v. 34, p. 461–470, 2006.
- BIGBEE, C.L.; GONCHOROFF, D.G.; VRATSANOS, G.; NADLER, S.G.; HAGGERTY, H.G.; FLYNN, J.L. Abatacept treatment does not exacerbate chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **Arthritis Rheum**. v. 56(8), p.2557-65, 2007.
- BONELLI, M.; GÖSCHL, L.; BLÜML, S.; KARONITSCH, T.; HIRAHARA, K.; FERNER, E.; SCHEINECKER, C. Abatacept (CTLA-4Ig) treatment reduces T cell apoptosis and regulatory T cell suppression in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. v. 55(4), p. 710-720, 2016.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 78(3), p. 206-209, 1982.
- BRANDI, G.; DABARD, J.; RAIBAUD, P.; DI BATTISTA, M.; BRIDONNEAU, C.; PISI, A.M. et al. Intestinal microflora and digestive toxicity of irinotecan in mice. **Clin Cancer Res**. v. 12, p. 1299–1307, 2006.
- BRASIL. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2015.
- BRUNTON, L.L. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 12ª ed., p. 1667, 1710-1712, 2012.

CABRERA-PEREZ, J.; CONDOTTA, S. A.; BADOVINAC, V. P.; GRIFFITH, T. S. Impact of sepsis on CD4 T cell immunity. **Journal of leukocyte biology**. v. 96(5), p. 767-777, 2014.

CHEADLE, W. G.; PEMBERTON, R. M.; ROBINSON, D.; LIVINGSTON, D. H.; RODRIGUEZ, J. L.; POLK, H. C. Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis. **J. Trauma**. v. 35, p. 844–849, 1993.

CHEN, X.; YE J. Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets and prognosis in patients with septic shock. **Microbiol. Immunol.** v. 55, p. 736–742, 2011.

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

CHOY, E. H., & PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**. v. 344(12), p. 907-916, 2001.

CUNHA, F. Q.; BOUKILI, M. A.; DA MOTTA, J. I. B.; VARGAFTIG, B. B., FERREIRA, S. H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **European journal of pharmacology**. v. 238(1), p. 47-52, 1993.

DAIKH, D. I.; FINCK, B. K.; LINSLEY, P. S.; HOLLENBAUGH, D.; WOFESY, D. Long-term inhibition of murine lupus by brief simultaneous blockade of the B7/CD28 and CD40/gp39 costimulation pathways. **The Journal of immunology**. v. 159(7), p. 3104-3108, 1997.

DAIKH, D.I. & WOFESY, D. Cutting edge: reversal of murine lupus nephritis with CTLA4Ig and cyclophosphamide. **J Immunol**. v. 166, 2913–2916, 2001.

DANION, F.; ROSINE, N.; BELKHIR, R.; GOTTENBERG, J.E.; HACHULLA, E.; CHATELUS, E.; PUGNET, G.; PERS, Y.M.; MARIETTE, X.; SIBILIA, J.; SEROR, R. Club Rhumatismes et Inflammation section of the French Society of Rheumatology Efficacy of abatacept in systemic lupus erythematosus: a retrospective analysis of 11 patients with refractory disease. **Lupus**. p. 1-8, 2016.

DAVIS, P.M.; ABRAHAM, R.; XU, L.; NADLER, S.G.; SUCHARD, S.J. Abatacept binds to the Fc receptor CD64 but does not mediate complement-dependent cytotoxicity or antibody-dependent cellular cytotoxicity. **J Rheumatol**. v. 34, p. 2204–10, 2007.

DRANITSARIS, G.; MAROU, J.; SHAH, A. Severe chemotherapy-induced diarrhea in patients with colorectal cancer: a cost of illness analysis. **Support Care Cancer**. v. 13, p.318–324, 2005.

DUBOIS, E.A. & COHEN, A.F. New drug mechanisms. Abatacept. **Br J Clin Pharmacol**. v. 68, p. 480–1, 2009.

DUNCAN, M. & GRANT, G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther**. v.18, p. 853–874, 2003.

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

ELTING, L.S.; SHIH, Y.C.; STIFF, P.J.; BENSINGER, W.; CANTOR, S.B.; COOKSLEY, C.; SPIELBERGER, R.; EMMANOULIDES, C. Economic impact of palifermin on the costs of hospitalization for autologous hematopoietic stem-cell transplant: analysis of phase 3 trial results. **Biology Blood Marrow Transplant**. v. 13(7), p. 806–813, 2007.

EMERY, P. The therapeutic potential of costimulatory blockade with CTLA4Ig in rheumatoid arthritis. **Expert Opin Investig Drugs**. v. 12, p. 673–81, 2003.

ENZINGER PC, KULKE MH, CLARK JW et al. A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig Dis Sci**. 50(12), p. 2218-23, 2005.

FUCHS, C.S.; MOORE, M.R.; HARKER, G.; VILLA, L.; RINALDI, D.; HECHT, J.R. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol**. v. 21(5), p. 807–814, 2003.

FUJII, H.; KOSHIYAMA, M.; KONISHI, M.; YOSHIDA, M., TAUCHI, K. Intermittent, repetitive administrations of irinotecan (CPT-11) reduces its side-effects. **Cancer detection and prevention**. v. 26(3), p. 210-212, 2002.

FUJITA, K.; KUBOTA, Y.; ISHIDA, H.; SASAKI, Y. Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**. v. 21(43), p. 12234-12248, 2015.

FURIE, R.; NICHOLLS, K.; CHENG, T. T.; HOUSSIAU, F.; BURGOS- VARGAS, R.; CHEN, S. L.; MERRILL, J. T. Efficacy and Safety of Abatacept in Lupus Nephritis: A Twelve- Month, Randomized, Double- Blind Study. **Arthritis & rheumatology**. v. 66(2), p. 379-389, 2014.

GENOVESE, M. C.; BECKER, J. C.; SCHIFF, M.; LUGGEN, M.; SHERRER, Y.; KREMER, J.; LI, T. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor α inhibition. **New England Journal of Medicine**. v. 353(11), p. 1114-1123, 2005.

GERRITS, C.J.; de JONGE, M.J.; SCHELLENS JH, STOTER G, VERWEIJ J Topoisomerase I inhibitors: the relevance of prolonged exposure for present clinical development. **Br J Cancer**. v.76(7), p. 952-62, 1997.

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

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

GIZINSKI, A. M., & FOX, D. A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. **Current opinion in rheumatology**. v. 26(2), p. 204-210, 2014.

GUIMARÃES, J. L. M. & ROSA, D. D. Rotinas em oncologia. Artmed Editora. 1ª edição. Porto Alegre, 2008.

HALL, P.D.; BENKO, H.; HOGAN, K.R.; STUART, R.K. The influence of serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol**. v. 23(12), p. 1256–60, 1995.

HOI, A. Y.; LITTLEJOHN, G. O. Abatacept in the treatment of lupus. **Expert opinion on biological therapy**. v. 12(10), p. 1399-1406, 2012.

IKUNO, N.; SODA, H.; WATANABE, M.; OKA, M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. **J Natl Cancer Inst**. v. 87(24), p. 1876-83, 1995.

IYER, L.; KING, C. D.; WHITINGTON, P. F.; GREEN, M. D.; ROY, S. K.; TEPHLY, T. R.; RATAIN, M. J. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. **Journal of clinical investigation**. v. 101(4), p. 847, 1998.

JANEWAY, C.A. & TRAVERS, P. The immune system in health and disease. Em: JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SCHLOMCHIK, M.J. Immunobiology, The immune system in health and diseases. New York: Garland Science Publishing; p. 461–613, 2005.

JANSEN, D. T.; EL BANNOUDI, H.; ARENS, R.; HABETS, K. L.; HAMEETMAN, M.; HUIZINGA, T. W.; TOES, R. E. Abatacept decreases disease activity in the absence of CD4+ T cells in a collagen-induced arthritis model. **Arthritis research & therapy**. v. 17(1), p. 1, 2015.

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** v. 14(6), p. 505–515, 2006.

KANEDA, N.; KURITA, A.; HOSOKAWA, Y.; YOKOKURA, T.; AWAZU, S. Intravenous administration of irinotecan elevates the blood β -glucuronidase activity in rats. **Cancer research**. v. 57(23), p. 5305-5308, 1997.

KEEFE, D.M.K. Gastrointestinal mucositis: a new biological model. **Support Care Cancer**. v. 12, p. 6–9, 2004.

KEEFE, D. M.; SCHUBERT, M. M. Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology.

Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. *Cancer*. v. 109 (5), p. 820 – 31, 2007.

KLIWINSKI, C.; KUKRAL, D.; POSTELNEK, J.; KRISHNAN, B.; KILLAR, L.; LEWIN, A.; NADLER, S.; TOWNSEND, R. Prophylactic administration of abatacept prevents disease and bone destruction in a rat model of collagen-induced arthritis. *J Autoimmun*. v. 25(3), p. 165-71, 2005.

KNOERZER, D.B.; KARR, R.W.; SCHWARTZ, B.D.; MENGLER-GAW, L.J. Collagen-induced arthritis in the BB rat. Prevention of disease by treatment with CTLA-4-Ig. *J Clin Invest*. v. 96(2), p. 987-93. 1995.

KO, H. J.; CHO, M. L.; LEE, S. Y.; OH, H. J.; HEO, Y. J.; MOON, Y. M.; PARK, K. S. CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cell population. *Journal of autoimmunity*. v. 34(2), p. 111-120, 2010.

KÖLLER, M.D. Abatacept: the evidence for its place in the treatment of rheumatoid arthritis *Core Evid*. v. 2(3), p. 163–172, 2007.

KÖRMENDY, D.; HOFF, H.; HOFF, P.; BRÖKER, B. M.; BURMESTER, G. R.; BRUNNER- WEINZIERL, M. C. Impact of the CTLA- 4/CD28 axis on the processes of joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. v. 65(1), p. 81-87, 2013.

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 chemotherapy and pharmacology*. v. 46(3), p. 211-220, 2000.

KWEEKEL, D.; GUCHELAAR, H. J.; GELDERBLUM, H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. *Cancer treatment reviews*, v. 34(7), p. 656-669, 2008.

LANGER, C.J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. *Oncology*, 18 (7), p. 17-28, 2004.

LE TULZO, Y.; PANGAULT, C.; GACOUIN, A.; GUILLOUX, V.; TRIBUT, O.; AMIOT, L.; TATTEVIN, P.; THOMAS, R.; FAUCHET, R.; DRENOU, B. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*. v. 18, p. 487–494, 2002.

LEITÃO, R.F.; BRITO, G.A.; ORIÁ, R.B.; BRAGA-NETO, M.B.; BELLAGUARDA, E.A.; SILVA, J.V.; GOMES, A.S.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; SIQUEIRA, F.J.; FREIRE, R.S.; VALE, M.L.; RIBEIRO, R.A. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterol*. v. 11, n. 1, p. 1, 2011.

LEITÃO, R.F.; RIBEIRO, R.A.; BELLAGUARDA, E.A.; MACEDO, F.D.; SILVA, L.R.; ORIÁ, R.B.; VALE, M.L.; CUNHA, F.Q.; BRITO, G.A. Role of nitric oxide on pathogenesis

of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 59(5), p. 603-12, 2007.

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

LIMA-JÚNIOR, R.C.; FIGUEIREDO, A.A.; FREITAS, H.C.; MELO, M.L.; WONG, D.V.; LEITE, C.A.; MEDEIROS, R.P.; MARQUES-NETO, R.D.; VALE, M.L.; BRITO, G.A.; ORIÁ, R.B.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 69(4), p. 931-42, 2012.

LIMA-JÚNIOR, R.C.; FREITAS, H.C.; WONG, D.V.; WANDERLEY, C.W.; NUNES, L.G.; LEITE, L.L.; MIRANDA, S.P.; SOUZA, M.H.; BRITO, G.A.; MAGALHÃES, P.J.; TEIXEIRA, M.M.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **Br J Pharmacol.** v.171(9), p. 2335-50, 2014.

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 mucositis. **Cancer chemotherapy and pharmacology.** v. 62(1), p. 33-41, 2008.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered?. **Cancer chemotherapy and pharmacology.** v. 63(2), p. 239-251, 2009.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; YEOH, A. S. J.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer treatment reviews.** v. 33(5), p. 448-460, 2007.

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

MASUBUCHI, N.; MAY, R. D.; ATSUMI, R. A predictive model of human myelotoxicity using five camptothecin derivatives and the in vitro colony-forming unit granulocyte / macrophage assay. **Clinical cancer research.** v. 10(19), p. 6722-6731, 2004.

MATHIJSSSEN, R. H.; VAN ALPHEN, R. J.; VERWEIJ, J.; LOOS, W. J.; NOOTER, K.; STOTER, G.; SPARREBOOM, A. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). **Clinical cancer research.** v. 7(8), p. 2182-2194, 2001.

MCGUIRK, P., & MILLS, K. H. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends in immunology.** v. 23(9), p.450-455, 2002.

MEASE, P.; GENOVESE, M.C.; GLADSTEIN, G.; KIVITZ, A.J.; RITCHLIN, C.; TAK, P.P.; WOLLENHAUPT, J.; BAHARY, O.; BECKER, J.C.; KELLY, S.; SIGAL, L.; TENG, J.; GLADMAN, D. Abatacept in the treatment of patients with psoriatic arthritis: results of a six-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. **Arthritis Rheum.** v. 63(4), 939-48, 2011.

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.** v. 61(5), p.775-84. 2008.

MERRILL, J. T.; BURGOS- VARGAS, R.; WESTHOVENS, R.; CHALMERS, A.; D'CRUZ, D.; WALLACE, D. J.; RAGHUPATHI, K. The efficacy and safety of abatacept in patients with non-life- threatening manifestations of systemic lupus erythematosus: Results of a twelve- month, multicenter, exploratory, phase IIb, randomized, double- blind, placebo- controlled trial. **Arthritis & Rheumatism.** v. 62(10), p. 3077-3087, 2010.

MILLS, K.H.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. **Semin Immunol.** v. 16, p. 107-17, 2004.

MONSERRAT, J.;PRIETO, A.; DÍAZ, D.; REYES, E.; DE MON, M. Á.; SÁNCHEZ, M. A.; DE PABLO, R. **Cellular and Molecular Markers of Outcome in Septic Shock.** INTECH Open Access Publisher, 2012.

MORELAND, L.; BATE, G.; KIRKPATRICK, P). Abatacept. **Nature Reviews Drug Discovery.** v. 5(3), p. 185-186, 2006.

MORELAND, L.W.; ALTEN, R.; VAN DEN BOSCH, F.; APPELBOOM, T.; LEON, M.; EMERY, P.; COHEN, S.; LUGGEN, M.; SHERGY, W.; NUAMAH, I.; BECKER, J.C. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4Ig and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. **Arthritis Rheum.** v. 46(6), p. 1470-9, 2002.

NAKAMURA, T.; KUMON, Y.; HIRATA, S.; TAKAOKA, H. Abatacept may be effective and safe in patients with amyloid A amyloidosis secondary to rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.** v. 32(4), p. 501-8, 2014.

NORLIN, J.; FINK, L. N.; KVIST, P. H.; GALSGAARD, E. D.; COPPIETERS, K. Abatacept Treatment Does Not Preserve Renal Function in the Streptozocin-Induced Model of Diabetic Nephropathy. **PloS one.** v. 11(4), e0152315, 2016.

O'DELL, J.R.; MIKULS, T.R.; TAYLOR, T.H.; AHLUWALIA, V.; BROPHY, M.; WARREN, S.R.; LEW, R.A.; CANNELLA, A.C.; KUNKEL, G.; PHIBBS, C.S.; ANIS, A.H.; LEATHERMAN, S.; KEYSTONE, E. Therapies for active rheumatoid arthritis after methotrexate failure. **N Engl J Med.** v. 369(4), p. 307-18, 2013.

PATAKAS, A.; JI, R. R.; WEIR, W.; CONNOLLY, S. E.; BENSON, R. A.; NADLER, S. G.; GARSIDE, P. Abatacept Inhibition of T Cell Priming in Mice by Induction of a Unique

Transcriptional Profile That Reduces Their Ability to Activate Antigen- Presenting Cells. **Arthritis & rheumatology**. v. 68(3), p. 627-638, 2016.

PEREIRA, V. B.; MELO, A. T.; ASSIS-JÚNIOR, E. M.; WONG, D. V.; BRITO, G. A.; ALMEIDA, P. R.; LIMA-JÚNIOR, R. C. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer chemotherapy and pharmacology**. v. 77(2), p. 323-332, 2016.

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), p. 2849-2855, 2004.

PERKINS, D.; WANG, Z.; DONOVAN, C.; HE, H.; MARK, D.; GUAN, G.; WANG, Y.; WALUNAS, T.; BLUESTONE, J.; LISTMAN, J.; FINN, P.W. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. **J Immunol**. v. 156(11), p. 4154-9, 1996.

PINELLI, D.F.; WAGENER, M.E.; LIU, D.; YAMNIUK, A.; TAMURA, J.; GRANT, S.; LARSEN, C.P.; SURI, A.; NADLER, S.G.; FORD, M.L. An anti-CD154 domain antibody prolongs graft survival and induces Foxp3(+) iTreg in the absence and presence of CTLA-4 Ig. **Am J Transplant**. v.13(11), p. 3021-30, 2013.

PITOT, H. C.; WENDER, D. B.; O'CONNELL, M. J.; SCHROEDER, G.; GOLDBERG, R. M.; RUBIN, J.; LEVITT, R. Phase II trial of irinotecan in patients with metastatic colorectal carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**. v. 15(8), p. 2910-2919, 1997.

PLATT, A. M.; GIBSON, V. B.; PATAKAS, A.; BENSON, R. A.; NADLER, S. G.; BREWER, J. M.; GARSIDE, P. Abatacept limits breach of self-tolerance in a murine model of arthritis via effects on the generation of T follicular helper cells. **The Journal of Immunology**. v. 185(3), p. 1558-1567, 2010.

RABBA, A. K.; SI, L.; XUE, K.; LI, M.; LI, G. In situ intestinal perfusion of irinotecan: application to P-gp mediated drug interaction and introduction of an improved HPLC assay. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**. v. 14(2), p. 138-147, 2011.

RAMESH, M.; AHLAWAT, P.; SRINIVAS, N. R. Irinotecan and its active metabolite, SN- 38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. **Biomedical Chromatography**. v. 24(1), p. 104-123, 2010.

RANG, H.P. ;DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 7^a ed., p. 673 – 676, 2012.

RIBEIRO, R.A.; WANDERLEY, C.W.; WONG, D.V.; MOTA, J.M.; LEITE, C.A.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; LIMA-JÚNIOR, R.C. Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemother Pharmacol**. v.78(5), p. 881-893, 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), p. 1529-33, 2003.

RIELLA, L. V.; LIU, T.; YANG, J.; CHOCK, S.; SHIMIZU, T.; MFARREJ, B.; CHANDRAKER, A. Deleterious Effect of CTLA4- Ig on a Treg- Dependent Transplant Model. **American Journal of Transplantation**. v. 12(4), p. 846-855, 2012.

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

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, p. 18-21, 2004.

RODRIGUES, C.E.; VIEIRA, F.J.; CALLADO, M.R.; GOMES, K.W.; DE ANDRADE, J.E.; VIEIRA, W.P. Use of the abatacept in a patient with psoriatic arthritis. **Rev Bras Reumatol**. v. 50(3), p. 340-5, 2010.

ROUGIER, P.; BUGAT, R.; DOUILLARD, J. Y.; CULINE, S.; SUC, E.; BRUNET, P.; BONNETERRE, J.; Phase II study of irinotecan in the treatment of advanced colorectal cancer in chemotherapy-naïve patients and patients pretreated with fluorouracil-based chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**. v. 15(1), p. 251-260, 1997.

RUBENSTEIN, E.B.; PETERSON, D.E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; MCGUIRE, D.; EPSTEIN, J. et al. Mucositis study section of the multinational association for supportive care in cancer; international society for oral oncology. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**. v. 100(9 Suppl, p. 2026–2046, 2004.

SAAG, K. G.; TENG, G. G.; PATKAR, N. M.; ANUNTIYO, J.; FINNEY, C.; CURTIS, J. R.; OUTMAN, R. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease- modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. **Arthritis Care & Research**. v. 59(6), p. 762-784, 2008.

SÁNCHEZ-LARA, K.; UGALDE-MORALES, E.; MOTOLA-KUBA, D.; GREEN, D. Gastrointestinal symptoms and weight loss in cancer patients receiving chemotherapy. **British Journal of Nutrition**. v. 109(05), p. 894-897, 2013.

SALTZ, L.B.; DOUILLARD, J.Y.; PIROTTA, N.; ALAKL, M.; GRUIA, G.; AWAD, L. et al Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. **Oncologist**. v. 6, p.81–91, 2001.

SCHWARZ, C.; UNGER, L.; MAHR, B.; AUMAYR, K.; REGELE, H.; FARKAS, A. M.; WEKERLE, T. The immunosuppressive effect of CTLA4Ig is treg- dependent at low, but not at high doses. **American Journal of Transplantation**, 2016.

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

SOARES, P.M.; LIMA-JUNIOR, R.C.; MOTA, J.M.; JUSTINO, P.F.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; SOUZA, M.H. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 68(3), p. 713-20, 2011.

SOARES, P.M.; MOTA, J.M.; SOUZA, E.P.; JUSTINO, P.F.; FRANCO, A.X.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine.** v. 61(1), p. 46-9, 2013.

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

SONIS, S.T. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. **J Support Oncol.** v. 5(9 Suppl 4), p. 3–11, 2007.

SPARREBOOM, A.; DE JONGE, M. J.; DE BRUIJN, P.; BROUWER, E.; NOOTER, K.; LOOS, W. J.; VERWEIJ, J. Irinotecan (CPT-11) metabolism and disposition in cancer patients. **Clinical cancer research.** v. 4(11), p. 2747-2754, 1998.

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

STRINGER, A.M.; AL-DASOOQI, N.; BOWEN, J.M.; TAN, T.H.; RADAZUM, M.; LOGAN, R.M.; MAYO, B.; KEEFE, D.M.K.; GIBSON, R.J. Potential biomarkers of chemotherapy-induced diarrhea: a clinical study of intestinal microbiome alterations; intestinal inflammation and circulating matrix metalloproteinases. **Support Care Cancer.** v. 21, p. 1843–1852, 2013.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; HIROHASHI, M.; KATO, M.; NOMURA, M.; NAGAI, E.; KAMATAKI, T. Involvement of β -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Research.** v. 56(16), p. 3752-3757, 1996.

TENG, G.G.; TURKIEWICZ, A.M.; MORELAND, L.W. Abatacept: a costimulatory inhibitor for treatment of rheumatoid arthritis. **Expert Opin Biol Ther.** v. 5, p. 1245–54, 2005.

THOMPSON, C. B.; LINDSTEN, T.; LEDBETTER, J. A.; KUNKEL, S. L.; YOUNG, H. A.; EMERSON, S. G.; JUNE, C. H. CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 86(4), p. 1333-1337, 1989.

WEISMAN, M.H.; DUREZ, P.; HALLEGUA, D.; ARANDA, R.; BECKER, J.C.; NUAMAH, I.; VRATSANOS, G.; ZHOU, Y.; MORELAND, L.W. Reduction of inflammatory biomarker response by abatacept in treatment of rheumatoid arthritis. **J Rheumatol.** v. 33(11), p. 2162-6, 2006.

WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, C. B.; BORGES, V. F.; WANDERLEY, C. W.; BEM, A. X.; CUNHA, T. M. The adaptor protein Myd88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis. **PloS one**. v. 10(10), e0139985, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 22/10/2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acesso em: 22/10/2016.

YAMADA, A.; SALAMA, A.D.; SAYEGH, M.H. The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. **J Am Soc Nephrol**. v. 13, p. 559–75, 2002.