



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM – FFOE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**RENATA DE BRITO FALCÃO HOLANDA**

**PAPEL DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 4 E POLIMORFISMOS  
ASP299GLY E THR399ILE NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL  
INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO IRINOTECANO**

**Fortaleza, 2018**

RENATA DE BRITO FALCÃO HOLANDA

**PAPEL DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 4 E POLIMORFISMOS  
ASP299GLY E THR399ILE NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL  
INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO IRINOTECANO**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior

Co-Orientadora: Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong

Fortaleza, 2018

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)

---

- H669p Holanda, Renata.  
Papel de receptores Toll-Like tipo 4 e polimorfismos ASP299GLY e THR399ILE na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico Irinotecano / Renata Holanda. – 2018.  
93 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.  
Coorientação: Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong.

1. Mucosite Intestinal. 2. Irinotecano. 3. Receptor Toll-Like 4. Polimorfismo. I. Título.

CDD 615

---

RENATA DE BRITO FALCÃO HOLANDA

**PAPEL DE RECEPTORES TOLL-LIKE TIPO 4 E POLIMORFISMOS  
ASP299GLY E THR399ILE NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL  
INDUZIDA PELO QUIMIOTERÁPICO IRINOTECANO**

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima-Júnior (orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

*À Deus.*

*À minha família, ao meu marido  
e a todos que me ajudaram e  
incentivaram o meu trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar pelo caminho da fé. É Ele quem me ilumina, me abençoa e me dar forças para continuar minha trajetória.

À minha mãe, Rosa, por ser um exemplo de mulher, de mãe, de esposa, de profissional e ser a grande responsável por eu estar aqui hoje. Obrigada pela sua dedicação incansável, por todo o amor que a senhora me proporciona e por sempre me apoiar.

Ao meu pai David, por ser um exemplo de pai dedicado, amoroso e atencioso. Sempre me apoiando e me incentivando a querer aprender mais. Obrigada pelo carinho, amizade e por tudo que fez e ainda faz por mim.

Às minhas irmãs, Rafaella e Luciana, pela cumplicidade, pelas orientações e por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao meu marido, Diego, por sempre estar ao meu lado, não importando as adversidades. Por ser meu alicerce e compreender tão bem esse momento. Obrigada por toda a ajuda, as explicações, a paciência e por todo amor que você me dar.

Ao meu orientador, professor Dr. Roberto César, por todo o companheirismo, atenção, ensinamento, motivação, orientação e acolhimento. Serei sempre grata por toda a dedicação e confiança depositada em mim. Por ser um exemplo de pessoa e profissional, sempre atencioso, bondoso e paciente. Muito obrigada por me ajudar em momentos que para mim pareciam ser tão difíceis.

À minha co-orientadora, profa. Dra. Deysi Wong, por todos os ensinamentos teóricos e práticos, por toda a sua gentileza e simpatia, e pelo imenso carinho que eu recebi. Obrigada por confiar em mim e ter se tornado além de minha co-orientadora, minha amiga.

Á minha querida amiga Camila Fernandes, por ter me ajudado no laboratório companhia diária. Por todos os risos e choros que passamos juntas.

Aos demais colegas do LAFICA, Larisse Lucetti, Lívia Nobre, Anielle Torres, Camila Meirelles, Venúcia Magalhães, Anamaria Falcão, Mário Lisboa, Rafael Santana. Obrigada pelo acolhimento, pelos momentos agradáveis juntos e por tornar esse caminho mais fácil.

Aos alunos de iniciação científica, Mariana Nour e Luis Borges, pelas horas dispensadas nas realizações dos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Citogenômica do Câncer, especialmente à Roberta Taiane e ao Howard Júnior, por me ajudarem na excussão dos experimentos.

Ao serviço de quimioterapia do HUWC, em especial gostaria de agradecer as enfermeiras Liduina Costa e Soraya Furtado por todo o esforço em conseguir pacientes para a minha pesquisa e ao médico Dr. Duílio em me ajudar nesse recrutamento.

Ao serviço de doação de sangue do HEMOCE, por proporcionar a coleta dos pacientes controles do estudo.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e por todas as contribuições dadas a este trabalho.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FUNCAP, pelo financiamento da pesquisa (FUNCAP e CNPq) e pela bolsa de mestrado (FUNCAP).

“O Senhor é meu pastor e nada me faltará”  
(Salmo 23)

## RESUMO

O câncer de colorretal (CCR) é umas das principais neoplasias atualmente, tanto devido a sua incidência quanto a sua mortalidade. Uns dos principais tratamentos para o CCR consiste no uso do irinotecano. Entretanto, esse quimioterápico pode desencadear um efeito colateral conhecido como mucosite intestinal, que cursa com uma intensa diarreia, afetando de forma direta a qualidade de vida do paciente, podendo acometer cerca de 20-40% dos pacientes em quimioterapia. Ainda não é totalmente esclarecida a fisiopatologia da mucosite, para a qual não existe tratamento específico. Assim, a investigação de mecanismos fisiopatológicos pode contribuir para a descoberta de biomarcadores ou novas estratégias terapêuticas. Estudos anteriores apontam o envolvimento no Toll-like receptor 4 (TLR4) no equilíbrio da homeostase intestinal. Contudo, o papel do TLR4 na patogênese da mucosite intestinal ainda não é compreendido. **Objetivo:** Avaliar o papel do TLR4 e polimorfismos desse receptor na patogênese da mucosite intestinal experimental e clínica. **Métodos:** Camundongos C57BL/6 machos (WT, 20-25g) ou deletados geneticamente para o receptor TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>), receberam salina (5 ml/kg, i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg, i.p.), uma vez ao dia/4 dias, para indução da mucosite intestinal. Os animais foram pesados diariamente e os escorres de diarreia foram medidos no sétimo dia após o início do tratamento. Após o sacrifício, uma amostra de intestino foi retirada para dosagem de mieloperoxidase e análise histopatológica e morfométrica. Clinicamente, o impacto de polimorfismos de TLR4 no curso da mucosite foi avaliado em pacientes com câncer colorretal. Para tanto, realizou-se um estudo coorte de genotipagem para os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) Asp299Gly (rs 4986790) e Thr399Ile (rs 4986791) do TLR4 em pacientes com CCR que faziam tratamento quimioterápico a base de irinotecano. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA/teste de Bonferroni ou Kruskal Wallis/teste de Dunn. Para genotipagem, as análises foram feitas através do Equilíbrio de Hardy-Weiberg e regressão logística. **Resultados:** A administração de irinotecano causou uma significativa perda ponderal e diarreia, associada a uma pronunciada infiltração de neutrófilos no intestino, alterações morfométricas e destruição da arquitetura das vilosidades e criptas em camundongos TLR4<sup>-/-</sup> quando comparados aos WT, nos quais não se verificaram tais alterações. Adicionalmente, os resultados da

genotipagem indicaram para o polimorfismo Asp299Gly uma associação do genótipo homocigoto selvagem A/A com uma diminuição de risco de desenvolvimento de CCR. Entretanto, não foi encontrada uma associação significativa dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile com variáveis clínicas como diarreia, dor abdominal e náusea. **Conclusão:** O TLR4 é essencial para manutenção da homeostase do intestino e proteção contra a toxicidade do irinotecano.

**Palavras-chaves:** Mucosite intestinal. Irinotecano. Receptor Toll-like 4. Polimorfismo.

## ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is a disease with high incidence and mortality. Irinotecan is an anticancer drug used as first and second-line therapy for CRC. Conversely, irinotecan-associated side effects include intestinal mucositis and severe diarrhea, which affect approximately 20-40% of patients undergoing chemotherapy, reducing patients' quality of life. The pathophysiology of mucositis is not completely known, the reason why no specific treatment is available. Then, the investigation of the underlying pathophysiological mechanisms can provide new disease biomarkers and/or novel therapeutic strategies. Previous studies report the involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) in the regulation of intestinal homeostasis. However, the role of TLR4 in the pathogenesis of intestinal mucositis is still to be investigated.

**Objective:** To evaluate the role of TLR4 and its receptor polymorphisms in the pathogenesis of experimental and clinical intestinal mucositis. **Methods:** C57BL/6 (WT, 20-25g) or TLR4 knockout mice (TLR4<sup>-/-</sup>) were injected with saline (5 ml/kg, i.p.) or irinotecan (45 mg/kg, i.p.) once daily/4 days for induction of intestinal mucositis. Animals were daily weighted and, on the seventh day post first dose of chemotherapy, diarrhea severity was assessed. The animals were killed and an ileum sample was harvested for myeloperoxidase assay and histopathological and morphometric analysis. In a clinical approach, the impact of TLR4 polymorphisms on mucositis development was verified through a genotyping cohort study in CRC patients. The study consisted on the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNP) Asp299Gly (rs 4986790) and Thr399Ile (rs 4986791) for TLR4 in patients with CRC who underwent irinotecan-based chemotherapy. Data were analyzed with ANOVA / Bonferroni test or Kruskal Wallis / Dunn test. For genotyping, analyzes were performed through the Hardy-Weiberg equilibrium and logistic regression.

**Results:** Irinotecan injection caused a significant body weight loss and increased diarrhea associated with neutrophil infiltration in the intestine, morphometric changes and destruction of the villi and crypts architecture in TLR4<sup>-/-</sup> mice versus WT animals, which showed no signs of intestinal injury. In addition, the genotyping study indicated that the Asp299Gly polymorphism was associated with the homozygous wild-type A/A genotype and with a decreased risk of CRC. However, there was no association of Asp299Gly or Thr399Ile polymorphism with diarrhea,

abdominal pain and nausea. **Conclusion:** TLR4 is essential for the maintenance of intestinal homeostasis and to protect from irinotecan-related intestinal damage.

**Key-words:** Intestinal mucositis. Irinotecan. Toll-like Receptor 4. Polymorphism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Marca Registrada do Câncer.....	20
Figura 2 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, por sexo, exceto pele não melanoma.....	21
Figura 3 –	Estruturas da Camptotecina, Topotecano e Irinotecano.....	24
Figura 4 –	Estrutura do SN-38.....	25
Figura 5 –	Metabolismo do irinotecano.....	26
Figura 6 –	Mecanismo de ação do irinotecano.....	27
Figura 7 –	Patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	31
Figura 8 –	Ligantes específicos para receptores Toll-like.....	32
Figura 9 –	Vias de sinalização TLR4.....	34
Figura 10 –	Localização dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile no receptor toll-like 4.....	37
Figura 11 –	Fluxograma metodológico do estudo.....	42
Figura 12 –	Representação dos graus de diarreia de acordo com o grau de intensidade, após a administração de irinotecano em camundongos.....	45
Figura 13 –	Condições para corrida de genotipagem.....	52
Figura 14 –	O SN-38 interage com o complexo MD-2/TLR4.....	55
Figura 15 –	Efeito da administração de irinotecano sobre a variação ponderal.....	56
Figura 16 –	Efeito da administração do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos C57BL/6.....	57
Figura 17 –	Alterações histopatológicas e morfométricas decorrentes da administração de irinotecano.....	59
Figura 18 –	Fotomicrografia da mucosa intestinal de camundongos C57BL/6 após a administração de irinotecano.....	60
Figura 19 –	Efeito da administração do irinotecano sobre a infiltração de	

neutrófilos no intestino de camundongos C57BL/6.....	61
Figura 20 – Porcentagem geral das variáveis estudadas no grupo CCR.....	62
Figura 21 – Genotipagem do polimorfismo Asp299Gly.....	63
Figura 22 – Genotipagem do polimorfismo Thr399Ile.....	66

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 –	Escores de avaliação da diarreia em camundongos.....	44
Quadro 2 –	Escore de análise histopatológica para intestino delgado.....	46
Quadro 3 –	Critérios Comuns de Toxicidade.....	49
Tabela 1 –	Efeito da administração do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos C57BL/6.....	58
Tabela 2 –	Frequência alélica, distribuição genotípica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos pacientes e controles para o rs 4986790 do TLR4 para o polimorfismo Asp299Gly dos indivíduos participantes da pesquisa.....	63
Tabela 3 –	Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson para associar a frequência gênica do SNP rs4986790 do gene do TLR4 com as variáveis estudadas.....	64
Tabela 4 –	Regressão logística multinomial para associar os genótipos do SNP rs4986790 do gene TLR4 entre o grupo controle e o de pacientes com CCR.....	65
Tabela 5 –	Frequência alélica, distribuição genotípica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos pacientes e controles para o rs 4986791 do TLR4 para o polimorfismo Thr399Ile dos indivíduos participantes da pesquisa.....	66
Tabela 6 –	Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson para associar a frequência gênica do SNP rs4986791 do gene do TLR4 com as variáveis estudadas.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluoracil
ANOVA	Análise de Variância
APC	7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1piperidino]carbonyloxycamptothecin
Asp	Ácido Aspartico
C57BL/6	Camundongos Imbred da espécie C57BL/6
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCR	Câncer de Colorretal
CCRm	Câncer de Colorretal Metastático
CE	Carboxilesterase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CPT	Camptotecina
CPT-11	Irinotecano
CTC	Critérios Comuns de Toxicidade
CYP3A4	Enzima do complexo citocromo P450 responsável pela conversão do irinotecano em seu metabólito ativo
DAMPs	Padões Moleculares Associados ao Dano
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio Imunoensimático
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FLOX	Combinação de oxaliplatina, leucovorin e fluorouracil em bolus Combinação de irinotecano, fluorouracil e leucovorin + infusão contínua de fluorouracil por 2 dias
FOLFIRI	Combinação de oxaliplatina, leucovorin e fluorouracil em bolus + fluorouracil em infusão contínua de 2 dias
FOLFOX	
Gly	Glicina
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
i.p	Intraperitonal
IFL	Combinação de irinotecano, fluorouracil e leucovorin em bolus
IKB	Inibidor de KB
IKK	Quinase IKB
IL-18	Interleucina-18
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 Beta
IL-33	Interleucina-33
Ile	Isoleucina
INOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
IRAK	Quinase Associada ao Receptor de Interleucina-1

IRAK1	Quinase 1 Associada ao Receptor de Interleucina 1
IRAK2	Quinase 2 Associada ao Receptor de Interleucina 1
IRAK4	Quinase 4 Associada ao Receptor de Interleucina-1
IRF	Fator Regulador de Interferon
KC	Keratinocyte Chemoattractant
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LPS	Lipopolisacarídeo
LRR	Repetições Ricas em Leucinas
MAPK	Proteína-Quinases Ativadas por Mitógenos
MD-2	Fator de Diferenciação Mieloide 2
MPO	Mieloperoxidase
MyD88	Fator de Diferenciação Mieloide 88
NaCl	Cloreto de Sódio
NCI	National Cancer Institute
NF-Kb	Fator Nuclear Kappa B
NLR	Receptores do tipo NOD
NO	Óxido Nítrico
NOD	Domínio de Oligomerização de Ligação de Nucleotídeo
NPC	7-Ethyl-10-[4-N-(1-Piperidino)-1-Amino]Carbonyloxycamptothecin
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
Pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
QPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucléico
Rs	Reference SNP
SN-38	7-Etil-10-Hidroxicamptotecina
SN-38G	SN38 Glucuronídeo
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TAB1	Proteína 1 de ligação a TAK1
TAK1	Quinase 1 Ativada por TGF- $\beta$
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Thr	Treonina
TIR	Receptor Toll/IL-1
TLR2	Receptor <i>Toll-like</i> tipo 2
TLR4	Receptor Toll-like tipo 4
TLR9	Receptor Toll-like tipo 9
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- $\alpha$	Fator De Necrose Tumoral Alfa
TOP I	Topoisomerase I
TRAF3	Fator 3 Associado ao Receptor de TNF
TRAF6	Fator 6 Associado ao Receptor TNF
TRAM	Molécula Adaptadora Relacionada com TRIF

TRIF	Adaptador que Contém o Domínio TIR
UFC	Universidade Federal do Ceará
UGT1A1	Polipeptídio A1 da Família Da Uridina Difosfato Glicosiltransferase 1
WT	Wild Típe (camundongos selvagens - C57BL/6)

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	20
<b>1.1</b>	<b>Câncer</b>	20
<b>1.2</b>	<b>Irinotecano</b>	24
<b>1.3</b>	<b>Mucosite Gastrointestinal</b>	27
<b>1.4</b>	<b>Receptor Toll-like 4</b>	31
<b>1.5</b>	<b>Polimorfismos do TLR4</b>	35
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	39
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	41
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
<b>4</b>	<b>PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS</b>	42
<b>4.1</b>	<b>Aspectos éticos</b>	42
<b>4.2</b>	<b><i>Docking</i> Molecular</b>	43
<b>4.3</b>	<b>Animais</b>	43
4.3.1	Análise ponderal	44
4.3.2	Avaliação do grau de diarreia	44
4.3.3	Contagem de leucócitos totais	45
4.3.4	Análise histopatológica e morfométrica da mucosa intestinal	46
4.3.5	Atividade da enzima Mieloperoxidase	47
<b>4.4</b>	<b>Pacientes</b>	47
4.4.1	Elegibilidade	48
4.4.2	Coleta de dados / Avaliação da toxicidade - mucosite	48
<b>4.5</b>	<b>Procedimentos laboratoriais com sangue periférico de amostras de pacientes</b>	49
4.5.1	Lise de células eritrocitárias	49
4.5.2	Extração de DNA por Trizol Reagente®	50
4.5.3	Genotipagem por qPCR	51
<b>4.6</b>	<b>Análise Estatística</b>	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	54
<b>5.1</b>	<b>O metabólito ativo do Irinotecano se liga diretamente ao receptor Toll-like 4</b>	54
<b>5.2</b>	<b>Avaliação dos parâmetros gerais da indução da mucosite intestinal por irinotecano</b>	55
<b>5.3</b>	<b>Estudo dos polimorfismos em pacientes com câncer de colorretal</b>	61
5.3.1	Análise do polimorfismo rs 4986790	62
5.3.2	Análise do polimorfismo rs 4986791	65
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	68

<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
<b>ANEXO 1</b> .....	86
<b>ANEXO 2</b> .....	87
<b>ANEXO 3</b> .....	91

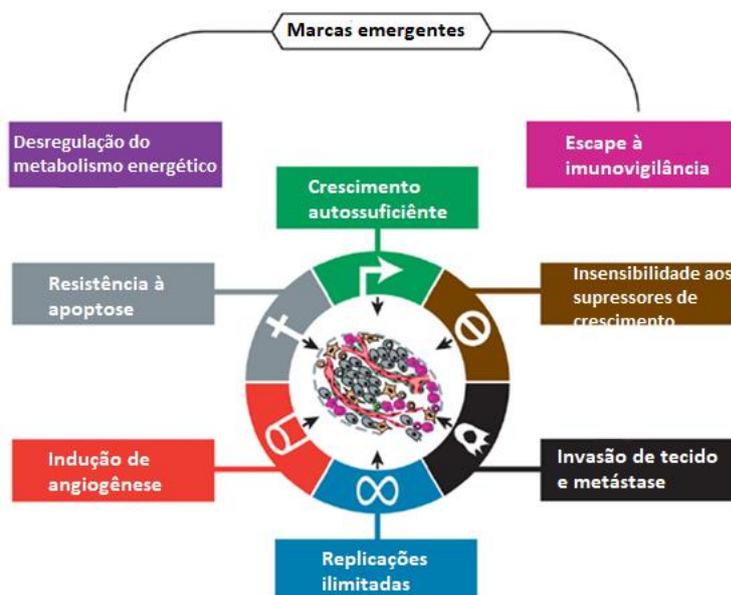
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

Câncer é o termo utilizado para definir um conjunto de doenças que tem como características a proliferação de células de maneira desordenada e a sua capacidade de invadir tecidos adjacentes ou até mesmo espalhar-se para outros órgãos, formando metástases (OMS, 2015).

São descritas como Marca Registrada do Câncer (*Hallmarks of Cancer*) alterações envolvendo células e tecidos, que podem ser resumidas em oito características: crescimento autossuficiente, insensibilidade aos supressores de crescimento, replicações ilimitadas, resistência à apoptose, angiogênese, invasão de tecido e metástase, e os dois últimos, definidos mais recentemente: reprogramação do metabolismo energético e escape a imunovigilância (figura 1).

Figura 1 – Marca Registrada do Câncer.



As marcas do câncer - capacidades distintas e complementares que permitem o crescimento do tumor e disseminação metastática.

Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

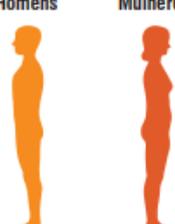
É indiscutível que o câncer, principalmente nos países em desenvolvimento, é um importante problema de saúde pública mundial, pois 70% das mortes por câncer

ocorrem em países subdesenvolvidos. É lícito mencionar que o câncer é a segunda causa de óbitos no mundo (OMS, 2015). Contudo, apenas 1 em cada 5 países de baixa e média renda fornecem dados necessários para incentivar a política de combate ao câncer (OMS, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 8,8 milhões de pessoas foram à óbito no ano de 2015 em virtude dessa doença em todo o mundo. Dentre os principais tipos de câncer responsáveis por esses números, tem-se pulmão (1,69 milhões de mortes), fígado (788.000 mortes), colorretal (774.000 mortes), estômago (754.000 mortes) e mama (571.000 mortes). Acredita-se que um terço das mortes por câncer são em decorrência de fatores comportamentais e alimentares, como, por exemplo, alto índice de massa corpórea, alimentação não saudável, sedentarismo, uso de tabaco e uso de álcool. Sendo assim, muitas mortes podem ser prevenidas, através da conscientização do paciente em evitar esses fatores de risco (OMS, 2017).

No Brasil, estimam-se que para cada ano do biênio 2018-2019, conforme ilustrado na **figura 2**, haverá 17.380 novos casos de câncer colorretal (CCR) em homens e 18.980 em mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer ocupa a quarta posição nos homens e a terceira nas mulheres na região Nordeste do país. Já no estado do Ceará, a estimativa para esse tipo de câncer é de 940 novos casos da doença, dentre os quais, 430 casos serão provenientes de Fortaleza (INCA, 2018).

Figura 2 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, por sexo, exceto pele não melanoma\*.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Próstata	68.220	31,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Estômago	13.540	6,3%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Estômago	7.750	3,8%
Esôfago	8.240	3,8%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Bexiga	6.690	3,1%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.390	3,0%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Leucemias	5.940	2,8%			Leucemias	4.860	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%					

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2018.

Apesar do crescente número de casos, em alguns países desenvolvidos, a incidência da doença vem diminuindo nos últimos anos, sendo uma resposta ao

rastreamento para detecção e remoção de lesões percutâneas. Porém, essa realidade não é a mesma para os países em desenvolvimento, pois o índice da doença vem aumentando nesses países (INCA, 2018).

O CCR é uma doença complexa que geralmente progride ao longo de vários anos. O seu desenvolvimento pode ser caracterizado como um processo dinâmico que envolve diferentes etapas, desde o aparecimento de pólipos adenomatosos pré-malignos até o CCR (COLEMAN; TSONGALIS, 2016).

Esse tipo de câncer engloba tumores que acometem um segmento do intestino grosso. É tratável e curável na maioria dos casos quando diagnosticado de maneira precoce e ainda quando não se encontra em metástase. O surgimento dessa doença acontece em quase todos os casos a partir de pólipos, que são lesões benignas que crescem na parede interna do intestino grosso. A detecção e remoção dos pólipos antes de se tornarem malignos é uma maneira de prevenir o aparecimento de tumores (INCA, 2018).

O risco de desenvolver a doença aumenta no decorrer da idade, porém, alguns fatores modificáveis podem estar associados com o aumento do risco, tais como obesidade, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo, consumo excessivo de carne vermelha ou processada, baixa ingestão de cálcio e alimentos ricos em fibras, frutas e vegetais. Fatores hereditários também aumentam o risco de desenvolver CCR, tais como histórico familiar ou pessoal de câncer colorretal e/ou pólipos, e história pessoal de doença inflamatória crônica (OMS, 2015).

O tratamento mais comum para o CCR não metastático é geralmente cirúrgico para remoção da área afetada e linfonodos adjacentes, podendo ser até mesmo curativo, sendo o estadiamento cirúrgico a principal ferramenta utilizada para estabelecer o estágio da doença nos pacientes recém diagnosticados. A profundidade da lesão na parede intestinal (T), o número de linfonodos acometidos (N), e a presença de metástases a distância (M) continuam sendo as informações mais relevantes para esta definição (EDGE *et al.*, 2010). O prognóstico desses pacientes varia conforme o estadiamento e a disponibilidade de tratamento. Por estágio do TNM, as taxas de sobrevivência variam, pois quanto mais precoce o diagnóstico maior a taxa de sobrevivência.

Os tumores colorretais têm grande potencial para disseminação à distância. Os sítios de metástases mais frequentes desse tipo de tumor são fígado (38-60%), linfonodos abdominais (39%), pulmão (38%), peritônio (28%), ovário (18%), adrenal (14%), pleura (11%), osso (10%) e cérebro (8%) (KEMENY; SEITER, 1993).

No CCR metastático (CCRm) a remoção cirúrgica de lesões metastáticas é uma importante opção de tratamento, porém, grande parte dos pacientes com a doença metastática apresentam tumores irressecáveis, com isso, a quimioterapia citotóxica é a principal forma de tratamento para esses pacientes (LEAL; FERREIRA; SASSE, 2017). Por várias décadas, o tratamento utilizado para o CCRm, baseava-se unicamente na terapia com 5-fluoracil (5-FU) (DOUILLARD *et al.*, 2000). Contudo, houve a incorporação de novas drogas como o irinotecano, a oxaliplatina e terapias alvo como o bevacizumabe, impactando no tempo de sobrevida dos pacientes (LEAL; FERREIRA; SASSE, 2017).

O tratamento de primeira linha utilizado para o tratamento de CCRm, atualmente, consiste na utilização de combinações de agentes citotóxicos em diferentes protocolos, como: 5-FU, leucovorin e oxaliplatina (FLOX e FOLFOX), ou irinotecano (FOLFIRI e IFL) (RIBEIRO *et al.*, 2016). Estudos multicêntricos demonstraram que a adição do irinotecano aos tratamentos convencionais com 5-FU para CCRm trouxeram ganhos para o regime em bolus (SALTZ *et al.*, 2000) ou infusional (DOUILLARD *et al.*, 2000). Pacientes que tiveram o acréscimo desse quimioterápico apresentaram uma melhor taxa de resposta (35% vs. 22%) maior tempo mediano para progressão (6,7 meses vs. 4,4 meses) e sobrevida global mediana (17,1 meses vs. 14,1 meses) quando comparados a pacientes sem uso do irinotecano. Porém, os regimes com o irinotecano se mostraram continuamente mais tóxicos, embora a toxicidade tenha sido considerada manejável. Posteriormente, esse agente citotóxico associado ao regime infusional de fluorouracil (FOLFIRI) se mostrou superior ao regime de combinação dele com fluorouracil em bolus (IFL) em sobrevida mediana livre de progressão (7,6 vs. 5,9 meses) (FUCHS *et al.*, 2008).

A despeito do claro avanço terapêutico, a ponto de melhorar o prognóstico de vários tumores, os pacientes oncológicos continuam sofrendo em demasia com os efeitos colaterais tóxicos da quimioterapia e radioterapia. Além disso, o conhecimento ainda insatisfatório da patogênese de boa parte dessas reações adversas se reflete no número bastante limitado de opções terapêuticas protetoras (BOSSI, *et al.*, 2015). Conseqüentemente, efeitos adversos sérios levam muitas vezes à interrupção da quimioterapia ou radioterapia, comprometendo a eficácia global do tratamento oncológico (BOSSI, *et al.*, 2015).

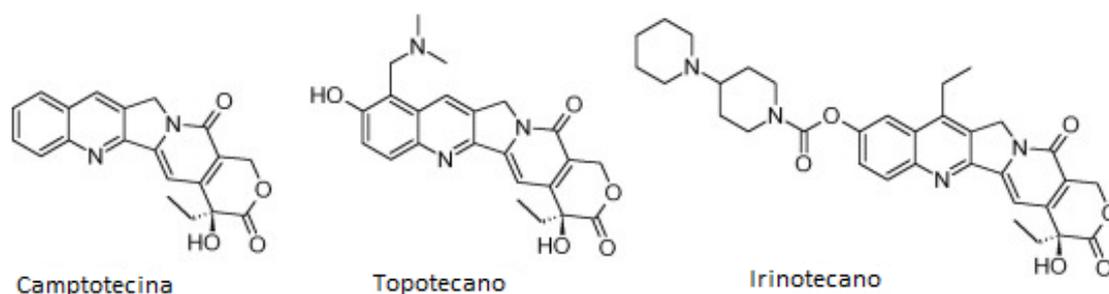
Nesse contexto, tem sido referido que as toxicidades gastrointestinais, entre outras estão estritamente relacionadas com a diminuição da adesão do paciente ao

tratamento oncológico. A questão é que a interrupção do tratamento, dependendo da doença e da fase da terapia, aumenta os custos para o sistema de saúde, tornando-se uma questão de saúde pública. Nos Estados Unidos estima-se um impacto econômico anual de 100-330 bilhões de dólares relacionado à falta de adesão ao tratamento oncológico (BOSSI, *et al.*, 2015). Infelizmente, no Brasil, não dispomos de dados demográficos e de farmacoeconomia relativos às toxicidades do tratamento oncológico.

## 1.2 Irinotecano

O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina (CPT). Esta foi primeiramente isolada a partir da casca da *Camptotheca acuminata* (árvore feliz chinesa) em 1966 por Wall e Wani, eles descobriram que o extrato dessa planta tinha uma atividade antitumoral em testes *in vitro* e em modelos experimentais de leucemia em murinos. O CPT é um alcalóide tipo quinolona, que possui uma baixa estabilidade e solubilidade e ainda ocasionou reações adversas graves em pacientes que estavam fazendo ensaios clínicos para câncer de cólon, assim, o composto deixou de ser testado. Porém no final da década de 80 foram realizadas modificações estruturais na CPT, devido a identificação da enzima topoisomerase I como alvo celular e indicando o seu mecanismo de ação antitumoral. Com isso, muitas moléculas foram produzidas a partir da estrutura da CPT, porém somente duas foram aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA), o irinotecano (CPT-11) e o topecano, como demonstrado na figura 3 (MARTINO *et al.*, 2017).

Figura 3 – Estruturas da Camptotecina, Topotecano e Irinotecano.

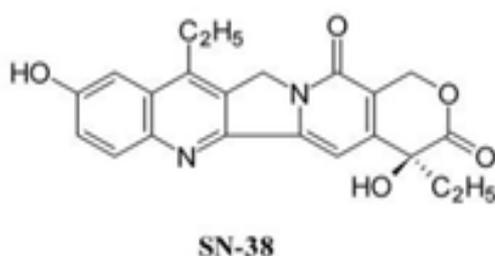


Fonte: MARTINO *et al.*, 2017.

O CPT-11 tornou-se disponível no Japão em 1994, para o tratamento de câncer de pulmão, colo de útero e ovário. Já em 1996, nos Estados Unidos, foi aprovado primeiramente para o tratamento do CCRm refratário ao 5-FU, e posteriormente aprovado para utilização em combinação com 5-FU e leucovorin, para o tratamento de primeira linha de CCRm (FUJITA, *et al.*, 2015).

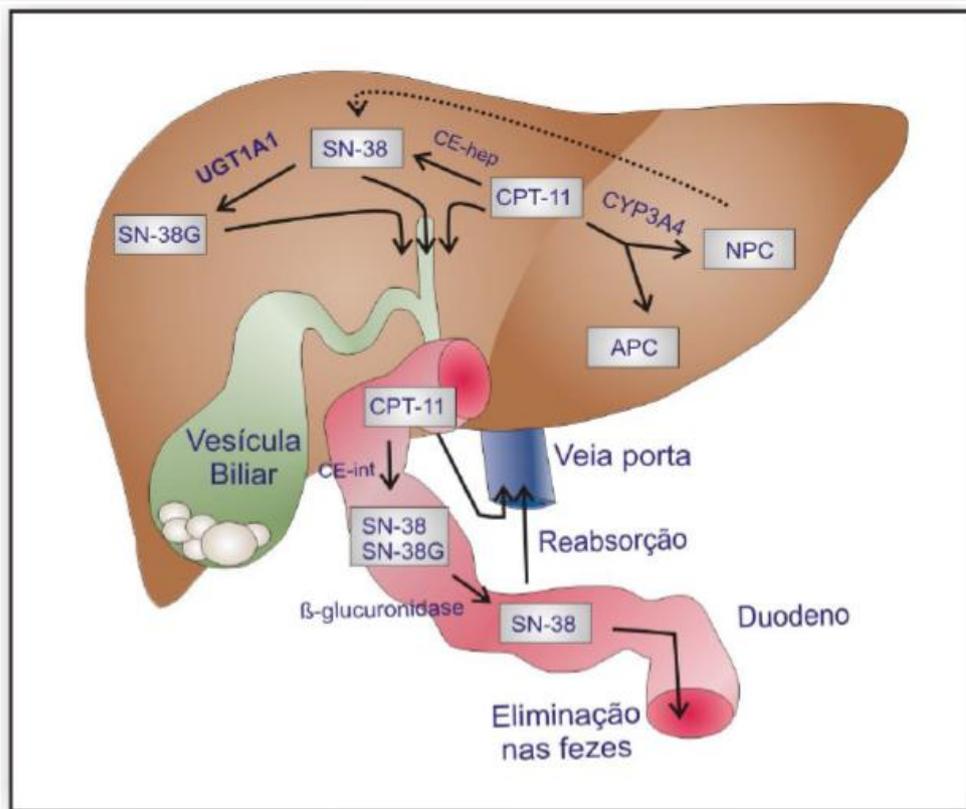
O irinotecano é um pró-fármaco que é convertido em seu metabólito ativo SN-38 (Figura 4) pela enzima carboxilesterase (CE). A ativação consiste na clivagem da cadeia lateral piperidina presente na posição C-10, originando o SN-38, que chega a ser 1000 vezes mais potente do que o CPT-11, sendo ainda o principal responsável pela sua eficácia e toxicidade. A CE encontra-se no fígado, plasma, intestino e tecidos tumorais (RIVORY, *et al.*, 1996). Após a clivagem o SN-38 sofre uma glucoronização pela enzima UGT1A1, formando o SN-38 inativo (SN-38G). Tanto a forma ativa como a forma sem efeito citotóxico são excretadas pela via biliar chegando no intestino, onde a forma inativa pode ser hidrolisada novamente ao SN-38 através da ação da  $\beta$ -glucuronodases produzidas bactérias intestinais (RABBA, *et al.* 2011). No fígado, o ele ainda é metabolizado pela enzima CYP3A4, gerando dois metabolitos inativos APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin) e NPC (7-ethyl-10-[4-N-(1-piperidino)-1-amino]carbonyloxycamptothecin), onde o NPC pode ser metabolizado pela CE em SN-38 (figura 5) (FUJITA, *et al.*, 2015).

Figura 4 – Estrutura do SN-38



Fonte: Adaptado de RABBA, *et al.* 2011.

Figura 5 - Metabolismo do Irinotecano.

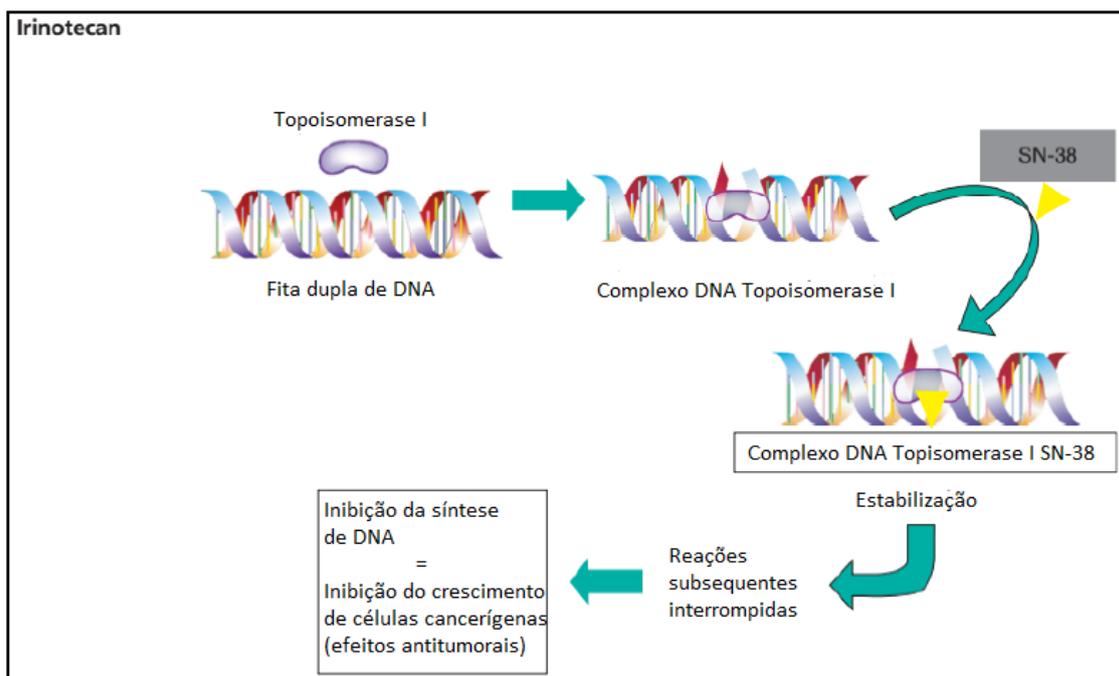


O fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o CPT-11 gerando dois compostos inativos, APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela carboxilesterase (CE) em SN-38. A depuração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

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

O mecanismo citotóxico do irinotecano (figura 6) consiste na inibição seletiva da enzima topoisomerase I (TOP I), enzima esta que está relacionada com a replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA. A TOP I, liga-se de modo covalente à dupla hélice de DNA, levando à quebra de uma das fitas, gerando um relaxamento da supertorção, o que permite a sua replicação. Após o relaxamento, a TOP I une as duas cadeias de DNA, restaurando a sua integridade. O irinotecano age formando um complexo não covalente entre a TOP I e as fitas de DNA, levando a uma quebra irreversível na cadeia de DNA, evitando a recombinação da fita dupla e consequentemente levando a uma morte celular (MARTINO *et al.*, 2017).

Figura 6 – Mecanismo de ação do Irinotecano.



Fonte: Sato, *et al.* 2008.

A toxicidade relacionada ao tratamento com o irinotecano ocorre devido ao acúmulo de seus metabólitos, principalmente do SN-38, no intestino (GUPTA *et al.*, 1994), sendo a mucosite gastrointestinal e a diarreia os efeitos colaterais mais comuns relacionados ao uso desse agente citotóxico, interferindo de maneira negativa na eficácia do tratamento (RIBEIRO *et al.*, 2016).

### 1.3 Mucosite Gastrointestinal

Mucosite alimentar ou gastrointestinal refere-se ao dano provocado nas mucosas (cavidade oral ou intestinal) originados pelo uso de quimioterapia e/ou radioterapia antineoplásicas. Geralmente essas lesões são dolorosas, podem ocorrer de maneira global ou localizada e prejudicam a ingestão nutricional do paciente. Os principais sintomas apresentados são dor, náusea, vômito, diarreia, entre outros, sendo a diarreia o sintoma mais marcante da mucosite intestinal. Esses sintomas são decorrentes da não-seletividade dos agentes quimioterápicos, visto que também afetam células epiteliais com alta taxa de proliferação no trato gastrointestinal (GIBSON; KEEFE, 2006).

Uma mucosite mais grave pode levar à redução da dose do quimioterápico ou até mesmo a interrupção do tratamento. Acomete cerca de 20% a 40% dos pacientes que

foram submetidos à terapia antineoplásica convencional, sendo altamente significativa e um fator dose-limitante do tratamento antineoplásico, afetando a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes (LALLA *et al.*, 2014).

A classificação da mucosite é realizada por meio de escores, utilizando os critérios comuns de toxicidade (CTC) desenvolvidos pelo *National Cancer Institute* (NCI) norte-americano: grau 0 (nenhum) – sem diarreia; grau 1 (leve) - aumento de até 4 evacuações ao dia; grau 2 (moderado) – aumento de 4 a 6 evacuações ao dia, indicação de hidratação venosa por tempo inferior a 24h; grau 3 (grave) – aumento maior ou igual a 7 evacuações por dia, incontinência, hidratação venosa por tempo superior a 24 horas e hospitalização; grau 4 – risco à vida; grau 5 – morte.

O aparecimento da mucosite geralmente ocorre no primeiro ciclo da quimioterapia. Um estudo realizado por Keefe *et al.*, (2014) constatou a ocorrência de mucosite grau 2 ou superior no ciclo 1 de quimioterapia em 50% dos pacientes com CCR que receberam FOLFIRI e 30% dos pacientes com CCR que foram tratados com FOLFOX. Ainda foi relatado episódios de mucosite em aproximadamente 10% dos pacientes que estavam entre o 3 ao 5 ciclo dos diferentes protocolos. E por fim, não foi significativo o número de casos de mucosite em pacientes nos ciclos 6 em diante. A incidência da diarreia como um todo nesses pacientes do estudo foi de 89% para FOLFIRI e 50% para FOLFOX, sugerindo que o irinotecano tem papel crucial no desenvolvimento da diarreia grave, quando incorporado aos regimes quimioterápicos.

A diarreia decorrente ao uso do irinotecano ocorre por dois mecanismos diferentes, fase inicial e tardia. A diarreia inicial ocorre até 24 horas após a administração do irinotecano, possui uma fisiopatologia colinérgica, sendo controlada com o uso de atropina administrada de maneira profilática. A diarreia tardia ocorre principalmente entre o sexto e o décimo dia após a administração do quimioterápico (TRIFAN *et al.*, 2002).

Não existe tratamento e nem prevenção para a mucosite intestinal, sendo geralmente utilizado como tratamento paliativo a loperamida, um fármaco opioide não analgésico de ação periférica que diminui a motilidade intestinal, controlando assim os episódios diarreicos (KEEFE *et al.*, 2014) sem afetar a lesão intestinal subjacente (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Porém, em casos mais graves de mucosite, como grau 3 e 4, a loperamida não é eficaz (GIBSON; KEEFE, 2006).

A patogênese da mucosite intestinal ainda não é totalmente esclarecida. Portanto, há interesse em uma melhor compreensão do mecanismo subjacente. Na

última década, contudo, tem-se verificado um significativo avanço. O Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) vem contribuindo com esse progresso através do desenvolvimento e aprimoramento de modelos experimentais de mucosite intestinal induzida por quimioterápico, a fim de cooperar com o entendimento das vias pelas quais esta se desenvolve (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2008.; SOARES *et al.*, 2011; LEITÃO *et al.*, 2011; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2013; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016; FERNADES *et al.*, 2018).

Nesse contexto, foi observado pelo nosso grupo que a administração de irinotecano na dose de 75 mg/kg/dia, por 4 dias consecutivos, em camundongos Swiss, sendo realizada a eutanásia no quinto ou sétimo dia após a primeira dose do quimioterápico, causa uma significativa diarreia, com diminuição da altura das vilosidades intestinais, perda da arquitetura das criptas e intenso infiltrado celular inflamatório. No mesmo trabalho, foi constatado que o irinotecano aumenta a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC (quimiocina análoga à IL-8 humana no camundongo) e que a utilização de inibidores de citocinas (pentoxifilina e talidomida) reduz significativamente os dados intestinais (MELO *et al.*, 2008).

A utilização de modelos experimentais permite a investigação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mucosite intestinal. Assim, foi estudado o papel de algumas citocinas e do óxido nítrico (NO) na patogênese da mucosite intestinal por diferentes quimioterápicos, como, 5-fluorouracil (SOARES *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2013), irinotecano (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012), metotrexato (LEITÃO *et al.*, 2007; LEITÃO *et al.*, 2011) ou a combinação de 5-fluorouracil e irinotecano (PEREIRA *et al.*, 2016). Com isso, foi demonstrado que na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, citocinas como a IL-18 e o TNF- $\alpha$  aumentam a expressão da enzima óxido nítrico sintase, catalisando a formação de NO, gerando assim intermediários reativos, como o peroxinitrito, sendo este o possível mediador final da lesão da mucosa em camundongos tratados com irinotecano.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são capazes de induzir uma inflamação através da ativação de um complexo citoplasmático multiproteico, conhecido como inflamassoma, onde este é composto por receptores semelhantes a NOD (NLR), que reconhecem moléculas associadas ao dano e ativam a caspase-1, que por sua vez, cliva a pró-IL1 $\beta$  e a pró-IL-18 para suas formas operacionais (CASSEL *et al.*, 2008; Schroder *et al.*, 2010). Assim, Lima-Júnior *et al.*, 2014, avaliou o envolvimento da IL-18 e

caspase-1 em camundongos com mucosite intestinal induzida por irinotecano, através da deleção gênica para IL-18 ou caspase-1 e o tratamento de animais selvagens com IL-18 bp, onde ocorreu a prevenção do desenvolvimento da diarreia, um aumento nos níveis de mieloperoxidase (MPO) e a imunomarcação para óxido nítrico sintase reduzida (iNOS).

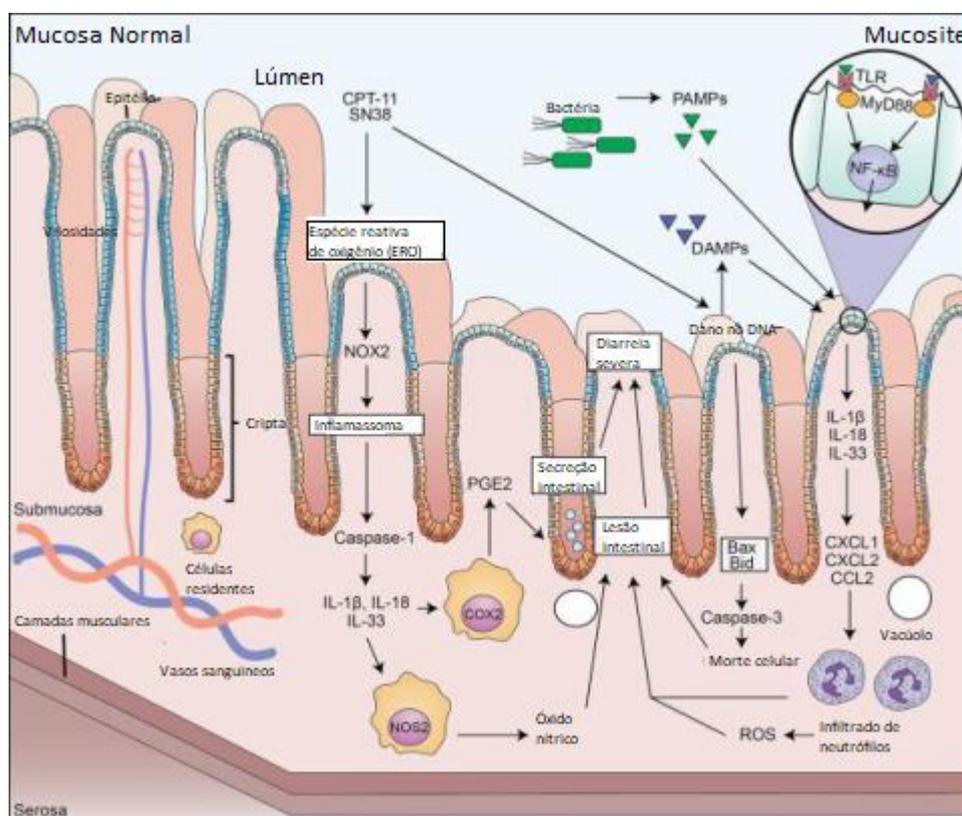
A microbiota intestinal tem papel fundamental em todas as fases da patogênese da mucosite. Camundongos tratados com irinotecano apresentam uma translocação bacteriana sistêmica e hepática, sugerindo o envolvimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) nessa doença (WONG *et al.*, 2015). A ativação da resposta imune inata no intestino é provocada por receptores de reconhecimento de patógenos, incluindo receptores do tipo toll-like (TLRs), que são capazes de reconhecer PAMPs e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Nesse contexto, Wong *et al.*, 2015, estudou o papel dos receptores de reconhecimento de padrão TLR2 e TLR9 e da proteína adaptadora MyD88 (fator de diferenciação mieloide 88), envolvida na via de sinalização desses receptores, através da utilização de camundongos *knockout* para TLR2, TLR9 ou MyD88. De forma interessante, animais com deleção gênica para TLR2 ou MyD88 e injetados com irinotecano apresentaram uma prevenção do dano intestinal. Em contrapartida, a deleção do TLR9 modulou a diarreia, sem, contudo, alterar o curso da inflamação subjacente. Esse achado, indica que os mecanismos de diarreia e de inflamação associados à mucosite podem coordenados por vias distintas uma da outra.

Adicionalmente, Frank *et al.*, 2015, demonstrou que camundongos *knockout* para TLR2 tratados com metotrexato apresentaram uma mucosite exacerbada. Já Sukhotnik *et al.*, 2014, demonstrou que a via de sinalização de TLR4/ MyD88 é protetora contra danos intestinais induzidos por metotrexato. E ainda foi demonstrado por Kaczmarek *et al.*, 2012, que as vias de sinalização de TLR2 e TLR9 desempenham um papel central no desencadeamento da mucosite intestinal induzida pela doxorubicina. Assim, sugere-se que a patogênese da mucosite parece ser fortemente dependente do agente quimioterápico utilizado.

Na figura 7, apresenta-se um resumo dos mecanismos patogênicos da mucosite intestinal por irinotecano. Resumidamente, o irinotecano e SN-38 induzem a apoptose através da geração de EROs, que ativam inflamassoma e IL-1, IL-18 e IL-33 por meio da caspase-1. Essas citocinas induzem células residentes a expressar COX-2 e iNOS, o que acarreta na produção de prostaglandinas e óxido nítrico, gerando um dano intestinal.

Em consequência, DAMPs e PAMPs estimulam TLR a ativarem NF- $\kappa$ B o que aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, que contribuem para a produção de quimiocinas e para o recrutamento de neutrófilos, amplificando a geração de espécies reativas de oxigênio e o dano intestinal (RIBEIRO *et al.* 2016). Apesar da clara descrição do fenômeno de translocação bacteriana durante a mucosite, bem como do papel de receptores TLR2 e TLR9 (WONG *et al.*, 2015), não há na literatura relatos quanto ao papel de receptores TLR4. Contudo, o perfil bacteriano em translocação é predominantemente de bactérias gram-negativas, que expressam ligantes de superfície para os receptores TLR4 (WONG *et al.*, 2013).

Figura 7 - Patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.



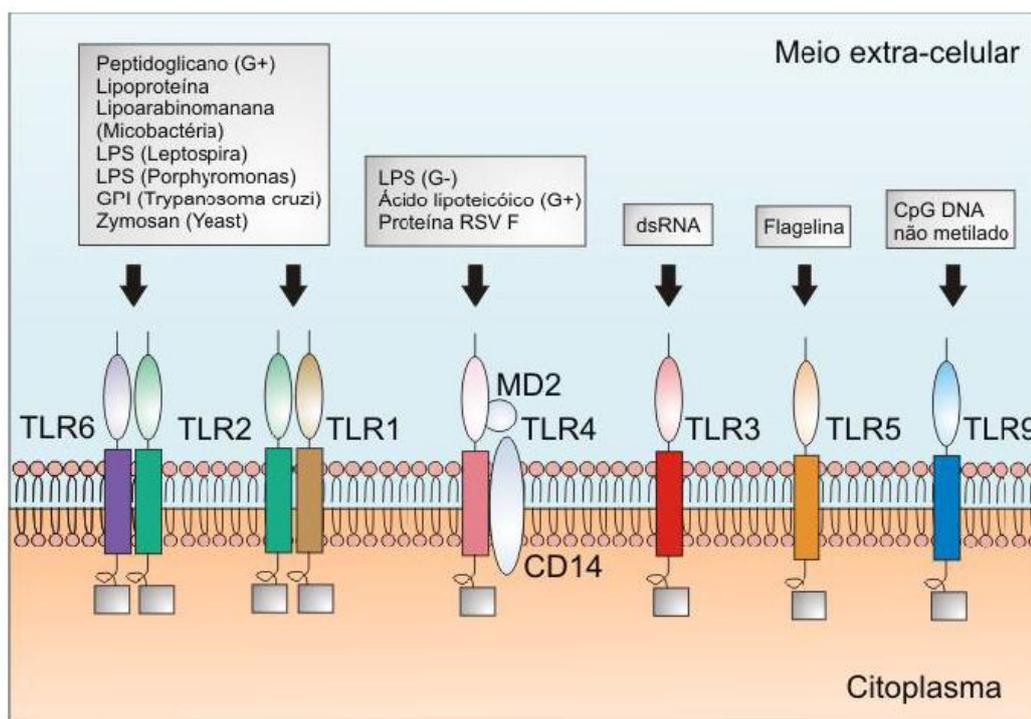
Fonte: Ribeiro, *et al.* 2016.

#### 1.4 Receptor Toll-like 4

Receptores Toll-like (TLRs) são expressos em células imunológicas (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e monócitos) e têm papel crítico nas respostas imunes contra patógenos invasores, pois funcionam como receptores de reconhecimento de padrão (PRR), sendo responsáveis por detectar patógenos invasores

fora da célula e nos endossomos e lisossomos intracelulares (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). De maneira geral, eles reconhecem moléculas endógenas liberadas no processo apoptose ou necrose celular, moléculas essas também conhecidas como DAMPs, e ainda reconhecem os PAMPs, como lipopolissacarídeo (LPS), DNA bacteriano, RNA viral, flagelina e peptidoglicano (figura 8) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Figura 8 – Ligantes específicos para receptores Toll-like.



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

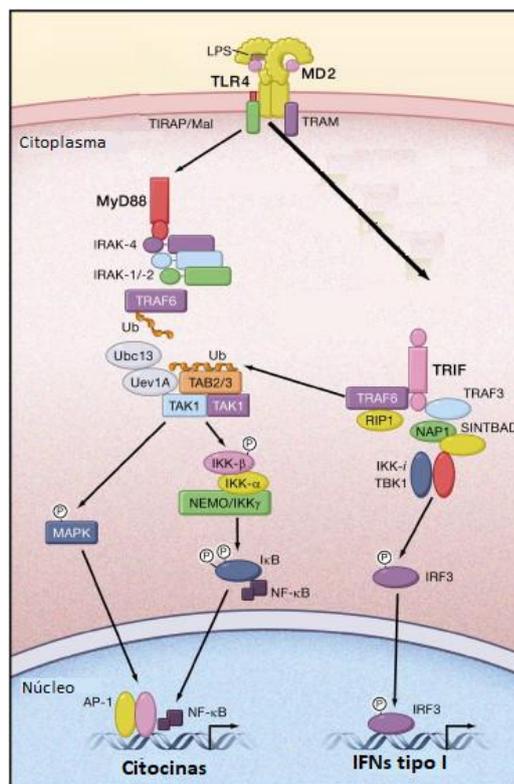
O receptor Toll-like 4 (TLR4) é expresso na membrana plasmática juntamente com o fator de diferenciação mielóide 2 (MD-2) e reconhece o LPS, componente derivado da membrana externa de bactérias Gram-negativas conhecido por induzir inflamações sistêmicas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). A cascata de sinalização desse receptor é complexa, tendo duas principais vias (figura 9), uma MyD88-dependente e uma MyD88-independente/TRIF-dependente. A diferença no tipo de sinalização ativada

vai depender do uso seletivo de diferentes combinações de moléculas adaptadoras e transdutoras de sinais (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

No caminho de sinalização MyD88 dependente, o domínio intracelular TIR (Toll/Receptor IL-1) se associa à molécula adaptadora MyD88. A MyD88 leva à fosforilação de resíduos serina/treonina da quinase IRAK4, onde este, após sua ativação, é responsável pela ativação, recrutamento e degradação do IRAK-1 e IRAK-2 (KAWAGOE *et al*, 2008). As IRAKs se desagregam do MyD88 e ligam-se com o TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF) que por sua vez ativa TAK1 (quinase 1 ativada por TGF- $\beta$ ) que forma um complexo com TAB1 (proteína 1 de ligação a TAK1), ativando a IKK (quinase I $\kappa$ B) e a cascata da MAPK. Com isso, o complexo IKK, composto por IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$  e IKK- $\gamma$ , é capaz de fosforilar uma proteína inibidora do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Essa fosforilação leva uma translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B para o núcleo e ativa a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias. A ativação da cascata da MAPK é responsável pela formação de outro complexo de fatores de transcrição, o AP-1 (proteína ativadora 1), que tem como alvo os genes que codificam citocinas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Na via de sinalização MyD88-independente/TRIF-dependente, o TLR4 requer uma molécula adaptadora relacionada ao TRIF (TRAM), para ativar o TRIF (proteína adaptadora contendo o domínio TIR, que induz IFN- $\beta$ ). O TRIF recruta TRAF3 (fator 3 associado ao receptor de TNF) que por sua vez se associa com o TBK1 e IKK- $\epsilon$ , responsáveis pela dimerização, translocação e ativação do fator IRF3 e IRF7, resultando na indução de IFN (interferon) tipo I e na expressão de genes induzidos por IFN (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Figura 9 – Vias de sinalização TLR4.



LPS é reconhecido na superfície celular por 2 conjuntos de complexos TLR4 / MD2. A estimulação do ligando recruta MyD88 e TIRAP para o TLR, e um complexo de IRAKs e TRAF6 são subsequentemente formados. O TRAF6 atua como uma ligase de ubiquitina E3 e catalisa a formação de uma cadeia de poliubiquitina ligada a K63 no próprio TRAF6 e geração de uma cadeia de poliubiquitina não conjugada com um complexo E2 ubiquitina ligase de Ubc13 e Uev1A. A ubiquitinação ativa um complexo de TAK1, TAB1 e TAB2 / 3 resultando na fosforilação de NEMO e na ativação de um complexo IKK. O IκB fosforilado é degradado, e o NF-κB liberado transloca-se para o núcleo, onde impulsiona a expressão de genes de citocinas. Simultaneamente, a TAK1 ativa as cascatas de MAP quinases levando à ativação de AP-1, que também é crítico para a indução de genes de citocinas. O LPS induz a translocação do TLR4 para o endossomo junto com o TRAM. TLR4 ativa a sinalização dependente de TRIF, que ativa NF-κB e IRF3 resultando na indução de genes de citocinas pró-inflamatórias e IFN tipo I. O TRAF6 e o RIP1 ativam o NF-κB, enquanto o TRAF3 é responsável pela fosforilação do IRF3 por TBK1 / IKK-*i*. NAP1 e SINTBAD são necessários para a ativação do TBK1 / IKK-*i*. O IRF3 fosforilado transloca-se no núcleo para induzir a expressão de genes IFN tipo I.

Fonte: Adaptado de Takeuchi; Akira, 2010.

Estudos mostraram que o LPS, além de induzir processos inflamatórios, pode promover a progressão tumoral, pois age diretamente nas células tumorais, levando a um aumento de proliferação e invasão da matriz por meio da regulação positiva do NF- $\kappa$ B (ANDREWS *et al*, 2001; WANG *et al*, 2003). Outro estudo relatou que a ativação do TLR4 pode estar envolvido no desenvolvimento de CCR aumentando a expressão de COX-2 e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (FUKATA *et al*, 2007). Assim, a associação do TLR4 com a inflamação e o câncer indica um potencial terapêutico de agonistas e antagonistas desse receptor (AWASTHI, 2014).

### 1.5 Polimorfismos do TLR4

Polimorfismo é definido como qualquer sequência variante ou alternativa de um alelo que ocupa um determinado loco gênico com uma frequência superior a 1% na população em geral. Entretanto, os alelos com frequência menor que 1% são chamados de variantes raras (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003; NUSSBAUM *et al*, 2008).

As variantes polimórficas funcionais observadas por múltiplos alelos para um dado loco é capaz de influenciar a expressão de determinado gene, ou mesmo de alterar sua atividade (NUSSBAUM *et al*, 2008). Alguns fatores são de grande importância no processo da gênese das doenças e impactam diretamente em sua expressão fenotípica. Dentre estes fatores, tem-se: meio ambiente, infecções, fumo, condições nutricionais e susceptibilidade genética prévia aos mais diversos tipos de doenças (MOHRENWEISER; WILSON; JONES, 2003).

Em busca de adaptar-se ao ambiente em que vivem, todos os organismos sofrem adaptações genéticas (KINANE; HART, 2003; TAKASHIBA; NARUISHI, 2006). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) é o tipo mais comum dentre os polimorfismos, onde ocorre a substituição de um único nucleotídeo por outro, levando a troca de um único par de base, na sequência de DNA entre os indivíduos, podendo assim afetar a expressão de proteínas, a estrutura e a função de um gene. Sua ocorrência é estimada em uma frequência de aproximadamente 1 para cada 1000pb por todo o genoma e inúmeros SNPs já foram mapeados (BROOKES, 1999).

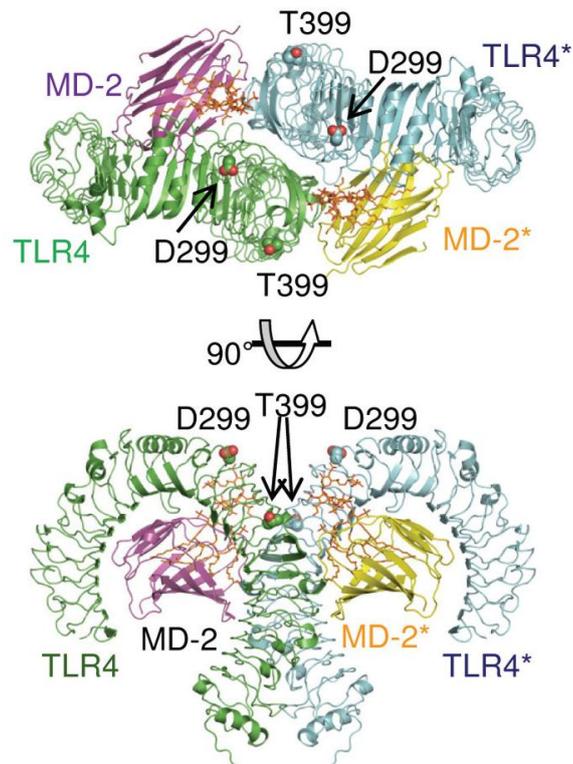
Em um levantamento realizado por Hollegaard e Bidwell, 2006, observaram-se associações de predisposição ou até mesmo proteção de SNPs em genes de citocinas,

contribuindo para o aumento ou diminuição do risco do paciente para a expressão fenotípica de doenças, como doenças infecciosas, doenças autoimunes ou câncer. Outros estudos com polimorfismo em genes de reparação constataam que essas modificações na sequência do gene apresentam significativa influência na modulação de efeitos genotóxicos, em resposta ao dano causado no DNA. Estudos ainda demonstram a influência de dezenas de polimorfismos de genes de reparo de DNA sobre atividades enzimáticas, incidência de câncer, resposta à quimioterapia e radiosensibilidade (EFFERTH; VOLM, 2005; WANG *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

O interesse de investigação nessa área tem sido observado também em relação aos polimorfismos em genes de TLRs, visto que estes podem contribuir para diferentes fenótipos de resposta, incluindo a susceptibilidade para o desenvolvimento do câncer (BERGMANN *et al.*, 2011; KUTIKHIN *et al.*, 2011).

O gene que codifica o TLR4 em humanos consiste em quatro exons e está localizado no cromossomo 9q32-q33 (OPAL; ESMON, 2003; ADEREM; ULEVITCH, 2000). Foi descrito, por sequenciamento desse gene, que a maior parte dos polimorfismos estão localizados no terceiro éxon, codificando para o domínio extracelular LRR do receptor (repetições ricas em leucina), influenciando assim a capacidade do receptor de se ligar patógenos que normalmente reconheceria (SMIRNOVA, *et al.* 2001) (figura 10). Dois polimorfismos funcionais (Asp299Gly e Thr399Ile) foram associados com um fenótipo hiporresponsivo ao LPS, onde o primeiro é uma substituição do ácido aspártico por uma glicina A/G, rs 4986790. Já o outro polimorfismo consiste na substituição da treonina por uma isoleucina C/T, rs 4986791 (ARBOUR, *et al.* 2000). Essas substituições levam à uma alteração do sítio receptor de ligação ao ligante (RALLABHANDI, *et al.* 2006).

Figura 10 – Localização dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile no receptor toll-like 4.



Representação geral cristalina do complexo \*MD-2/TLR4/LPS humano. Ambos os polimorfismos estão localizados na metade C-terminal do domínio extracelular.

Fonte: Yamakawa, *et al.*2012.

A descoberta de que esses dois polimorfismos apresentam um efeito sobre capacidade de resposta ao LPS, levou ao desenvolvimento de muitos estudos. Porém, os resultados de tais estudos levaram a conclusões contraditórias sobre o papel desses polimorfismos e seu efeito na sensibilidade a infecções bacterianas, por exemplo (SCHRÖDER; SCHUMANN, 2005). O polimorfismo Asp299Gly tem sido alvo de vários estudos envolvendo diferentes tipos de câncer. Apetoh, *et al.* (2007) mostraram que essa variação específica no gene tem um impacto negativo no prognóstico em pacientes com câncer de mama, pois pacientes que apresentam o alelo polimórfico recidivam mais rapidamente após radioterapia e quimioterapia baseada em antraciclinas se comparados àqueles pacientes com alelos selvagens/normais.

Bergmann *et al.* (2011) sugeriram que estes polimorfismos podem estar envolvidos no avanço de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço e, ainda, que esses genótipos parecem ter um impacto no sucesso da terapia antitumoral. Tem-se

verificado que polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile de TLR4 impactam diretamente no risco de câncer associados às lesões gástricas pré-cancerosas e em câncer de vias biliares (KUTIKHIN, 2011). Em contrapartida, não há clara indicação de que eles alterem o risco para o câncer de próstata. Em relação ao CCR, mama e linfoma, os resultados são conflitantes, sendo necessários mais estudos nesses grupos de pacientes. Contudo, não há estudos relacionados à susceptibilidade de pacientes oncológicos colorretais ao desenvolvimento de toxicidades gastrintestinais

## 2 JUSTIFICATIVA

Mucosite alimentar ou gastrointestinal refere-se ao dano provocado nas mucosas (cavidade oral ou intestinal) devido ao uso de quimioterapia e/ou radioterapia. Diversos fármacos têm sido associados ao estabelecimento dessa toxicidade, como irinotecano, 5-fluorouracil, metotrexato e doxorrubicina. Aproximadamente 25% dos pacientes em tratamento com regimes baseados em irinotecano apresentam diarreia grave, com até sete evacuações líquidas ao dia, o que é classificado como diarreia grau 3. Os mecanismos associados a esta toxicidade ainda não são plenamente conhecidos. Contudo, sabe-se que durante o dano epitelial intestinal, há maciça translocação bacteriana para órgãos estéreis, como o fígado, causando um substancial aumento do risco de sepse e morte do paciente, pois além da mucosite, o irinotecano também causa mielotoxicidade. No contexto da patogênese dessa lesão intestinal, a translocação bacteriana tem levado à hipótese da participação de receptores para padrões moleculares associados a patógenos, como o receptor toll-like tipo 4 (TLR4), importante para o reconhecimento de lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas. Contudo, o papel desse receptor ainda não foi efetivamente demonstrado. Adicionalmente, os polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile de receptores TLR4 tem sido associados ao risco aumentado de câncer gástrico e de vias biliares.

O estudo de genotipagem tem sido amplamente utilizado como instrumento para predição de um determinado fenótipo. Assim, quando se estuda um indivíduo do ponto de vista genético, pode-se prever sua capacidade de resposta a um determinado fármaco, além de se verificar o risco do estabelecimento de um efeito indesejável associado ao tratamento. As possíveis aplicações da farmacogenética são muitas, dentre as quais incluem-se: a identificação de novos alvos terapêuticos, o desenvolvimento de exames genéticos para a escolha de fármacos e, até mesmo, um “desenho” individual de moléculas para ligar em alvos específicos (REIS, 2006). Portanto, o desenvolvimento de pesquisas que correlacionem polimorfismos de receptores localizados na membrana celular é uma área de alta relevância científica, incluindo o estudo em pacientes com câncer de colorretal.

Nesse sentido, no contexto clínico, ainda não se sabe qual a relevância dos referidos polimorfismos para a susceptibilidade à toxicidade associada aos fármacos antineoplásicos, como a mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, nem qual a real

relevância para o desenvolvimento de câncer colorretal, sendo estes os objetivos primários do presente trabalho.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do receptor Toll-like 4 (TLR4) na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico Irinotecano.

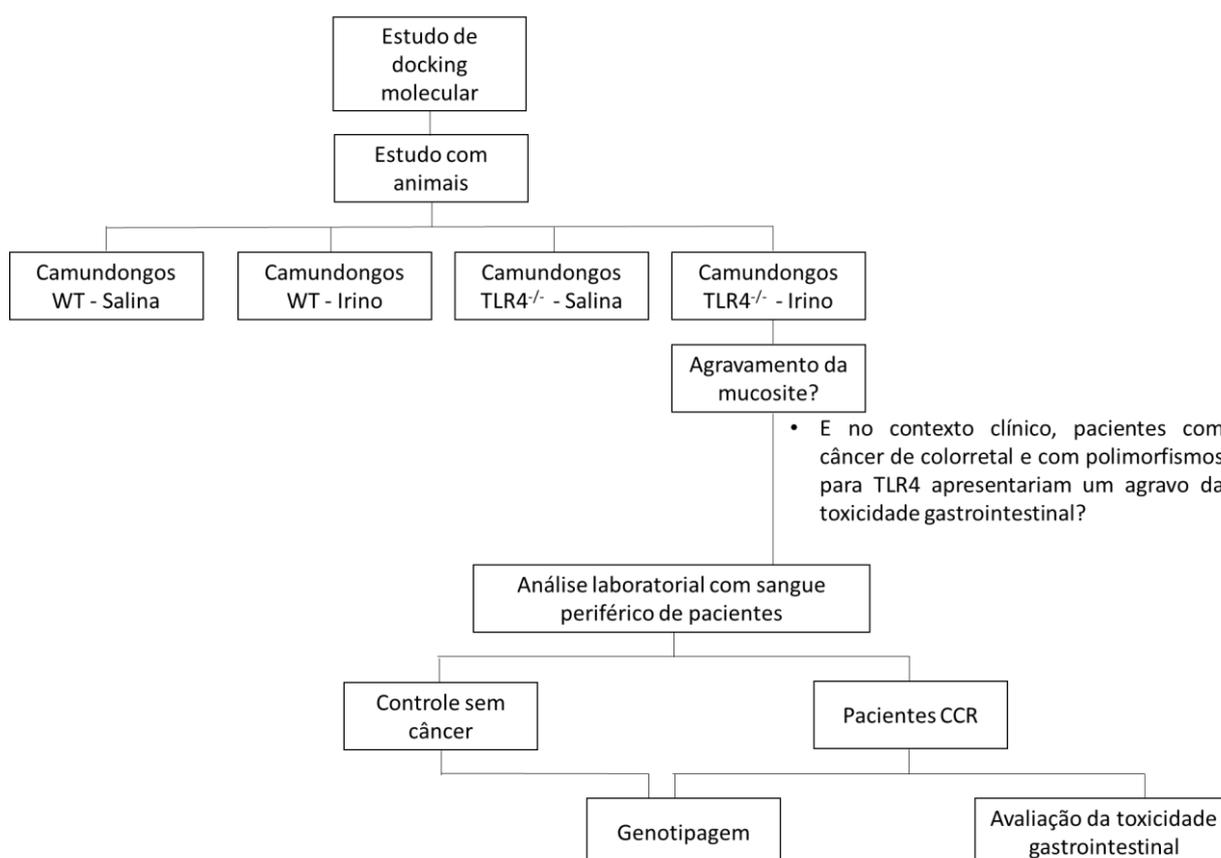
#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar a posição de ligação do SN-38 e o LPS no complexo MD-2/TLR4.
- Investigar se a deleção gênica para receptores TLR4 agrava a mucosite intestinal em animais.
- Associar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile em pacientes com câncer de colorretal e em controles sem câncer;
- Correlacionar a frequência dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile com o grau de diarreia e gravidade da mucosite intestinal em pacientes com câncer de colorretal.

## 4 PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em três etapas distintas, onde primeiramente foi realizado um estudo de *docking* molecular, seguido de um estudo experimental e por fim estudo clínico conforme apresentado na figura 11.

Figura 11 – Fluxograma metodológico do estudo.



### 4.1 Aspectos éticos

Os protocolos desenvolvidos foram de acordo com os Padrões de Uso de Animais de Laboratório da Universidade Federal do Ceará (UFC). A pesquisa foi previamente submetida à Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC e aprovada de acordo com o protocolo CEPA nº 99/10 (ANEXO 1). Para a parte clínica, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFC, com o número de CAAE 65206216.7.0000.5054 (ANEXO 2).

## 4.2 Docking Molecular

Foi utilizado o software Autodock 4.2 para a ancoragem molecular, no intuito de prever o local de interação entre o SN-38 e o complexo MD2/TLR4. A estrutura tridimensional do SN-38 foi construída e geometricamente otimizada usando o software Avogadro 1.1.0. A estrutura do complexo MD-2/TLR4 de camundongos foi obtida no Banco de Dados de Proteínas (PDB:2Z64). Foi permitido o número máximo de torções para o ligante, até a proteína ser considerada rígida. Foram adicionados hidrogênios e as cargas parciais de Gasteiger foram calculadas usando o AutoDockTools-1.5.6.

O docking iniciou-se utilizando uma grade que cobria todo o complexo MD-2/TLR4. O número de avaliações de energia e de ancoragem foram definidos para 2.500.000 e 1.000, respectivamente. Após isso, foi realizada uma restrição da grade aos locais onde foi obtido os melhores resultados de interação. Para essa etapa, os números de avaliações de energia e de ancoragem foram definidos 25.000.000 e 50, respectivamente. A avaliação estrutural dos modelos de ancoragem foi realizada usando o software UCSF Chimera. Para isso, a estrutura cristalográfica do complexo MD-2-TLR4 com o seu ativador LPS (PDB: 3VQ2) foi alinhada com os modelos de ancoragem para comparar os locais de ligação entre as posições ancoradas do ligante e o LPS. As imagens finais dos modelos foram criadas utilizando também o software UCSF Chimera.

## 4.3 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, pesando entre 20 e 25 gramas. Estes animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Adicionalmente, utilizaram-se camundongos *knockout* para receptor Toll-like 4 (TLR4<sup>-/-</sup>) machos, pesando entre 20 e 25 gramas, originalmente obtidos pelo Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA), criados e fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

O modelo utilizado para a indução de mucosite foi de acordo com o protocolo desenvolvido por Ikuno *et al*, 1995 e adaptado por Melo *et al*, 2007 e por Lima-Júnior *et al*, 2012 no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer. Os animais

receberam administração de Irinotecano, na dose de 45 mg/kg, por via intraperitoneal ou salina (5 mL/kg), por quatro dias consecutivos e avaliados no 7º dias após a primeira administração.

#### 4.3.1 Análise ponderal

A massa corpórea dos animais foi medida em gramas (g). Os animais foram pesados diariamente durante todo o período do experimento, sendo os valores encontrados expressos em % de variação da massa corpórea em relação a massa inicial, onde 100% correspondeu ao peso do animal no primeiro dia de experimento.

#### 4.3.2 Avaliação do grau de diarreia

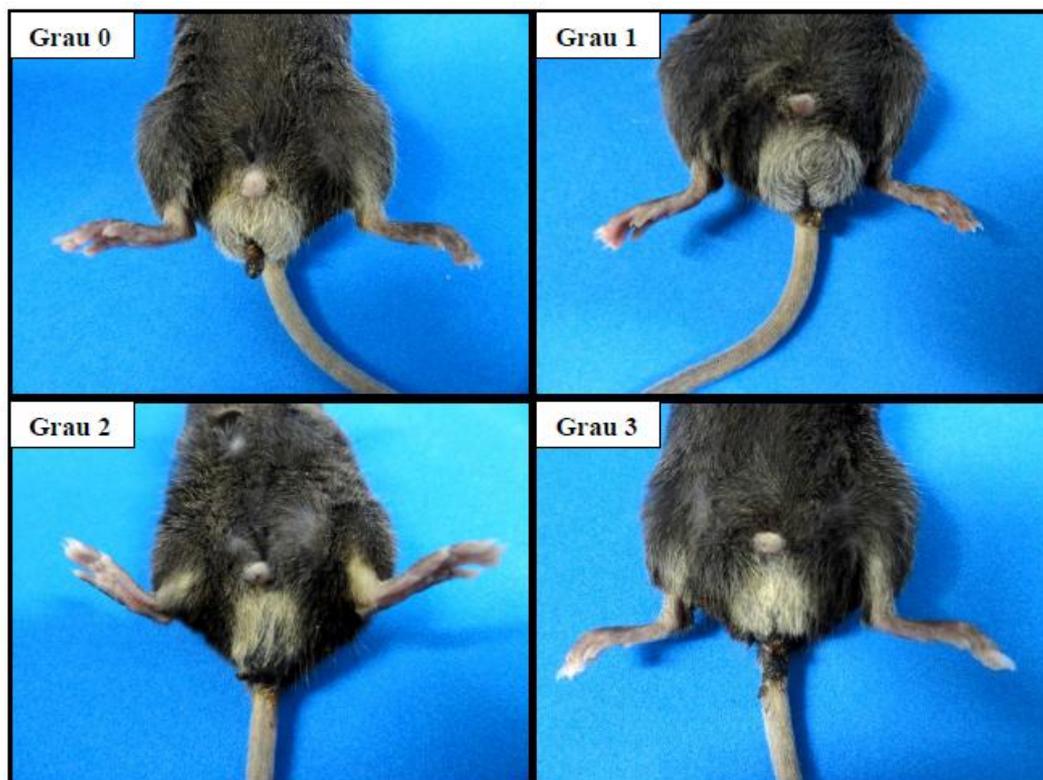
Os eventos diarreicos ocorridos no sétimo dia após o início do tratamento com o irinotecano foram classificados de acordo com os escores propostos por Kurita *et al.*, 2000 (quadro 1). A diarreia representa um indicativo de indução da mucosite, sendo esse evento o mais observado na prática clínica (figura 12).

Quadro 1 – Escores de avaliação da diarreia em camundongos.

<b>Escore</b>	<b>Avaliação da diarreia</b>
Escore 0	Fezes com aspecto normal
Escore 1	Fezes levemente alteradas, pouco umedecida
Escore 2	Fezes úmidas com pouca sujidade perianal
Escore 3	Fezes úmidas com bastante sujidade perianal

Fonte: Kurita *et al.*, 2000

Figura 12 – Representação dos graus de diarreia de acordo com o grau de intensidade, após a administração de irinotecano em camundongos.



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

#### 4.3.3 Contagem de leucócitos totais

Esse parâmetro hematológico é necessário para a verificação do efeito do irinotecano na indução da leucopenia. Os animais foram levemente anestesiados com tribromoetanol 2.5% (10 ml/kg, i.p.) para coleta de sangue pelo plexo retro-orbital, e em seguida foi realizada a contagem de leucócitos totais em contador automático de células (Coulter Ac.T). Os valores foram expressos como números de células  $\times 10^3/\mu\text{L}$ . A leucopenia serve como observação de controle para a manutenção da atividade citotóxica do quimioterápico sobre o animal, visto que o animal não apresenta sítio tumoral.

#### 4.3.4 Análise histopatológica e morfométrica da mucosa intestinal

Após a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, foram removidos segmentos de 0,5 cm do íleo dos camundongos. Em seguida, as amostras foram fixadas em formol tamponado 10% e processadas para coloração pelo método H&E (hematoxilina-eosina).

A análise histopatológica do intestino delgado foi através da observação das aspectos das vilosidades e criptas, e pela presença e intensidade do infiltrado inflamatório (microscopia óptica, magnificação 400x). O grau e a gravidade da mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores sugerido por Woo *et al.*, 2000 (quadro 2).

Quadro 2 – Escore de análise histopatológica para intestino delgado.

<b>Escore</b>	<b>Análise Histopatológica</b>
Escore 0	Ausência de lesão
Escore 1	Menos de 10% das criptas contêm células necróticas
Escore 2	Mais de 10% das criptas contêm células necróticas, entretanto, a arquitetura permanece intacta
Escore 3	Mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (<20%), as vilosidades encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes
Escore 4	Semelhante a 3, porém, é mais extensa com perda da arquitetura das criptas e encurtamento das vilosidades

Fonte: Woo *et al.*, 2000

A análise morfométrica, teve como objetivo obter a medida quantitativa morfológica de vilosidades (levando em consideração o ponto de encontro entre duas vilosidades até o topo destas – parâmetro altura da vilosidade) e criptas intestinais (delimitada como o ponto de encontro entre duas vilosidades com mensuração até a margem da camada submucosa – profundidade da cripta) para se correlacionar com a capacidade absorptiva (razão altura das vilosidades/profundidade das criptas). Esses parâmetros morfométricos foram calculados em  $\mu\text{m}$  utilizando-se o software ImageJ

versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilosidades e criptas por corte histopatológico, em microscopia óptica 100x.

#### 4.3.5 Atividade da enzima Mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de infiltrado de neutrófilos no tecido inflamado.

Uma porção de íleo foi coletada e incubada em 200 µL de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7). Em seguida, os tecidos foram homogeneizados com a ajuda de triturador (Pollytron) e o homogenato foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, seguido da adição de 1000 µL de NaCl 0,2% para realizar um choque hipotônico no sedimento celular (*pellet*). Após uma nova centrifugação igual à primeira, o *pellet* foi ressuspenso em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e realizou-se um novo ciclo de homogeneização com triturador Pollytron. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e, após a centrifugação, 50 µL do sobrenadante obtido foram colocados em placas de 96 poços para o ensaio. Foi adicionado, em cada poço, 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3'-tetramethylbenzidine: 1,6 mM) e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e a placa foi incubada por 5 minutos a 37 °C. Após a incubação, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 2N. Foi realizada a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (onde o primeiro poço continha 1 x 10<sup>5</sup> neutrófilos/ poço/ 50 µL). Realizou-se as leituras da absorbância das amostras leitor de placas no comprimento de onda de 450 nm. E por fim, os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de tecido (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

#### 4.4 Pacientes

O estudo foi realizado no ambulatório de oncologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), situado no bairro Rodolfo Teófilo. A população estudada foi de pacientes com diagnóstico citológico ou histológico de Câncer Colorretal candidatos à quimioterapia com base em 5-fluoruracil e irinotecano ou irinotecano isolado. Os

voluntários incluídos no estudo foram atendidos no ambulatório, convidados, pelo pesquisador responsável e/ou médico do setor envolvido com esta pesquisa, a participar do estudo e a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 3).

As amostras de sangue dos voluntários controles foram obtidas através de uma alíquota de 4 mL das bolsas de sangue de doadores saudáveis no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

#### 4.4.1 Elegibilidade

Critérios de inclusão:

Foram incluídos pacientes, atendidos no ambulatório de oncologia, com diagnóstico citológico ou histopatológico de Câncer Colorretal candidatos à quimioterapia baseada em irinotecano e 5-fluoruracil em 1ª ou segunda linha, que apresentassem as seguintes características:

- ✓ Acompanhamento mínimo de 12 semanas;
- ✓ Interesse voluntário em participar da pesquisa confirmado pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- ✓ Idade de 21-80 anos (adultos).

Critérios de exclusão:

- ✓ Diagnóstico de outra Neoplasia em atividade;
- ✓ Gestação em andamento;
- ✓ Doenças autoimunes;
- ✓ Uso de corticoides ou imunossuppressores;
- ✓ Doenças cursando com imunossupressão.

#### 4.4.2 Coleta de dados / Avaliação da toxicidade - mucosite

Os pacientes estudados foram acompanhados semanalmente pelo pesquisador no intuito de detectar qualquer alteração que pudessem ter ocorrido com o paciente nos intervalos da quimioterapia, como alterações do ritmo intestinal e sintomas associados à toxicidade gastrointestinal, como dor abdominal, náuseas/vômitos e diarreia (quadro 3), bem como o consumo de loperamida e outros tratamentos instituídos.

Os pacientes ainda foram acompanhados por análise de prontuário e através de conversas com o médico responsável.

Quadro 3 – Critérios Comuns de Toxicidade.

<b>Escores</b>	<b>Diarreia</b>	<b>Náuseas</b>	<b>Dor abdominal</b>
<b>Grau 0</b>	Sem diarreia	Sem náusea	Sem dor
<b>Grau 1</b>	Aumento de < 4 evacuações ao dia	Consegue comer	Dor leve, sem interferir na função
<b>Grau 2</b>	Aumento de 4 – 6 evacuações ao dia	Ingestão oral significativamente menor	Dor moderada; dor ou analgésicos que interferem na função, mas não interferem nas atividades diárias
<b>Grau 3</b>	Aumento de $\geq 7$ evacuações ao dia	Ingestão não significativa, requer líquidos IV	Dor severa; dor ou analgésicos que interferem fortemente nas atividades cotidianas
<b>Grau 4</b>	Risco a vida	-	Incapacidade

Fonte: Critérios Comuns de Toxicidade do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI-CTC).

#### 4.5 Procedimentos laboratoriais com sangue periférico de amostras de pacientes

Foram coletados 4 mL de sangue periférico, em tudo EDTA, de pacientes com câncer de colorretal que aceitaram participar da pesquisa. A coleta aconteceu antes do início da quimioterapia. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas por inversão e colocadas em banho de gelo para serem utilizadas.

##### 4.5.1 Lise de células eritrocitárias

Esse procedimento tem como objetivo a obtenção de pool de células nucleadas em trizol para preservação de ácidos nucleicos e proteínas. A partir desse método eliminam-se as células eritrocitárias, proporcionando um material mais limpo para extração.

A amostra de sangue fresco foi centrifugada a 1810 g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação foi feita a separação do plasma com o concentrado de células (células vermelhas e brancas) e esse concentrado foi transferido para um tubo contendo 25 mL de solução de lise gelado (NH<sub>4</sub>Cl 0,144M, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1M). A seguir, o material contendo as células e o tampão foi incubado em banho de gelo por 15 minutos para ocorrer o processo de hemólise. O material hemolisado foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, seguido do descarte do sobrenadante e obtenção do *pellet* contendo as células nucleadas. Em seguida, adicionaram-se 250 µL de PBS 1x e 750 µL de Trizol Reagente® para homogeneização e posterior transferência para um microtubo estéril de 1,5 mL e armazenamento em temperatura de -80°C.

#### 4.5.2 Extração de DNA por Trizol Reagente®

A extração de DNA foi realizada a partir das células nucleadas conservadas em Trizol. Para cada 750 µL de Trizol Reagente® foram adicionados 200 µL de clorofórmio para desproteinização e posterior centrifugação a 14.000 RPM por 15 min a 4°C.

Após a completa remoção da fase aquosa (RNA), foi adicionado ao tubo contendo a interfase (DNA) e a fase orgânica (proteínas e compostos fenólicos) 500 µL de solução *back extraction buffer* (Isotiocianato de guanidina 4M, Citrato de sódio di-hidratado 50mM, Tris- HCl 1M, pH8,0) e em seguida incubado por 30 minutos a 25°C sob agitação constante. Após incubação, centrifugou-se a 12000g por 15 minutos a 4°C. A seguir, o sobrenadante e a interfase foram transferidos para um microtubo estéril e adicionados 400 µL de isopropanol, misturando por inversão. O material foi então incubado a -20°C por 12 h para uma melhor precipitação do DNA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante (proteínas e demais contaminantes), o *pellet* de DNA foi lavado com 500 µL de Etanol 70% e centrifugado novamente por mais 2 minutos. O processo de lavagem foi repetido 4 vezes por amostra. Foi retirado o álcool de lavagem e o *pellet* foi deixado secar com o tubo aberto por 40 minutos em temperatura ambiente. Após adição de 30 µL de água DNase/RNase *free* para hidratação por 30 minutos em temperatura ambiente, foi realizada uma incubação de 10 minutos a 60°C.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 220, 260 e 280nm para aferição de pureza, concentração e contaminação das amostras, e

por fim o material foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior realização dos experimentos de genotipagem.

#### 4.5.3 Genotipagem por qPCR

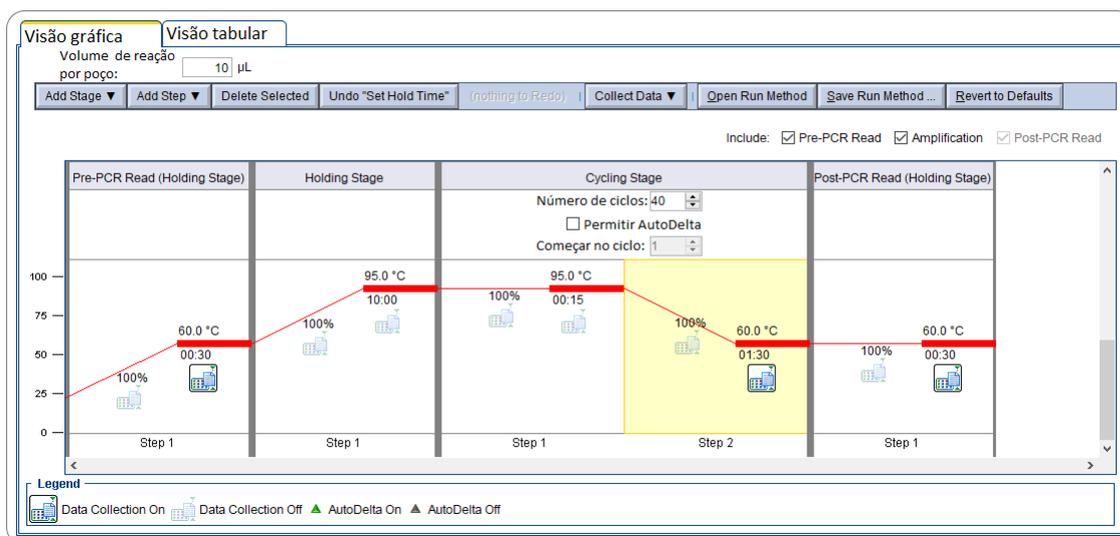
Foram utilizados ensaios de genotipagem TaqMan da Applied Biosystems <sup>TM</sup>, cada ensaio permite a genotipagem do indivíduo para um polimorfismo de nucleotídeo único, escolhidos a partir do snp referencial (rs) obtidos no banco de dados do NCBI.

O DNA extraído foi utilizado para identificação de polimorfismos de nucleotídeo único do receptor toll-like 4, Asp299Gly (rs 4986790) e Thr399Ile (rs 4986791). A genotipagem desses polimorfismos foi feita através da técnica conhecida como PCR em tempo real, ou qPCR, que é uma evolução do método de PCR (reação em cadeia da polimerase). Essa técnica baseia-se na duplicação de DNA “in vitro” que pode ser repetida diversas vezes, amplificando quantidade de DNA suficiente para realizar diversas análises. Os ensaios de qPCR associam essa metodologia com um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzidas durante os ciclos de amplificação, sendo utilizados para detecção e quantificação específica e sensível de alvos de ácido nucléico.

Para cada um dos polimorfismos analisados foi efetuada uma prévia otimização das condições de PCR e da quantidade de amostra a ser utilizada. As reações de PCR foram efetuadas num volume de reação de 10  $\mu\text{L}$ , em que as misturas de PCR para os diferentes polimorfismos contiveram 5  $\mu\text{L}$  de TaqMan *Genotyping* Master Mix, 0,5  $\mu\text{L}$  de TaqMan *Genotyping* Assay Mix e 4,5  $\mu\text{L}$  de DNA (amostra).

Foi utilizado o aparelho Fast 7500 (Applied Biosystems®) nas condições de ciclagem representadas pela figura 13.

Figura 13 – Condições para corrida de genotipagem.



Fonte: próprio autor.

#### 4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism®, versão 5.0, empregando o teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni ou Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn, conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos, baseando-se na continuidade das variáveis em análise. Os resultados foram expressos com média  $\pm$ E.P.M. (erro padrão da média) para as variáveis com distribuição normal ou pela mediana (mínimo-máximo) para as variáveis sem distribuição normal, sendo a diferença considerada estatisticamente significativa quando  $P < 0,05$ .

As diferenças entre as distribuições genóticas e alélicas e a análise do Equilíbrio de Hardy-Weiberg ( $P > 0,05$ ) foram analisadas com o teste de qui-quadrado (com um grau de liberdade) ou teste exato de Fisher. O teorema de Hardy-Weinberg consiste na base teórica da genética das populações, avaliando o princípio do equilíbrio gênico no processo evolutivo, consistindo em uma importante análise na verificação da população proposta nos estudos de polimorfismos.

A análise de regressão logística foi utilizada para estimar a razão de chances (*odds ratio*) para as variáveis que contribuem para o risco de CCR e para ajustar as análises de fatores de confusão que contribuem para a susceptibilidade de CCR. O nível de significância estatística utilizado foi  $P < 0,05$  (*2-tail*) e todas as análises foram

efetuadas com recurso ao software SPSS para Windows na versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

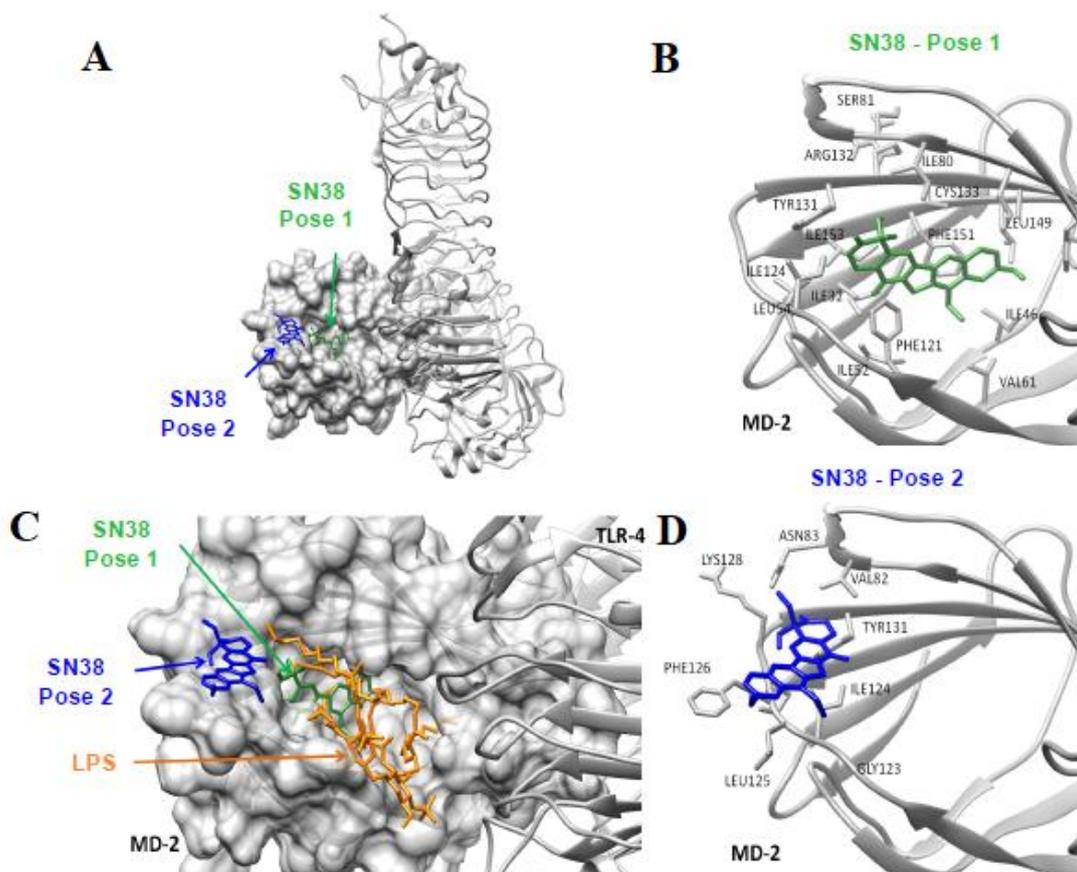
## 5 RESULTADOS

### 5.1 O metabólito ativo do Irinotecano se liga diretamente ao receptor Toll-like 4

Foi realizada a ancoragem molecular para testar a potencial interação direta entre o SN-38 e TLR4, onde na primeira etapa constatou-se dois possíveis locais de ligação para o SN-38, ambos os locais estavam localizados na proteína MD-2 e próximos um do outro (figura 14A). A melhor posição de ligação do SN-38 ao ligante foi localizada numa bolsa hidrofóbica (figura 14B). O segundo local, na posição 2, encontra-se no sítio hidrofóbico na borda da molécula MD-2 (figura 14C).

Em seguida, foi realizada uma análise mais refinada na segunda etapa do procedimento de acoplamento. A interação de ligação de melhor pontuação na posição 1 foi uma energia de  $-7,2\text{kcal/mol}$ , onde foi possível observar que nessa posição, a molécula de SN-38 interagiu principalmente com resíduos hidrofóbicos (PHE151, VAL61, ILE32, ILE52, LEU54, TYR131, ILE124), que notavelmente esta bolsa é o mesmo local de interação do LPS. Já na posição 2, a menor energia de ligação foi de  $-5,9\text{ kcal/mol}$ , onde o SN-38 interagiu com resíduos hidrofóbicos (PHE126, ILE124, TYR131, GLY123, VAL82) (figura 14D). Tal orientação permitiu uma formação de ligação de hidrogênio entre o grupo hidroxilo do anel pirano do SN-38 e a PHE126.

Figura 14 – O SN-38 interage com o complexo MD-2/TLR4.



A interação entre SN-38 e TLR4 foi verificada por docking molecular. (A) Principais locais de interação entre o SN-38 (verde e azul) e o complexo MD-2/TLR4 (cinza). (B) Melhor pose ancorada do SN-38 (verde) na parte hidrofóbica da proteína MD-2. (C) Comparação entre os locais de pose do SN-38 (verde e azul) e LPS (laranja). (D) Melhor pose ancorada do SN-38 (azul) na borda da proteína MD-2.

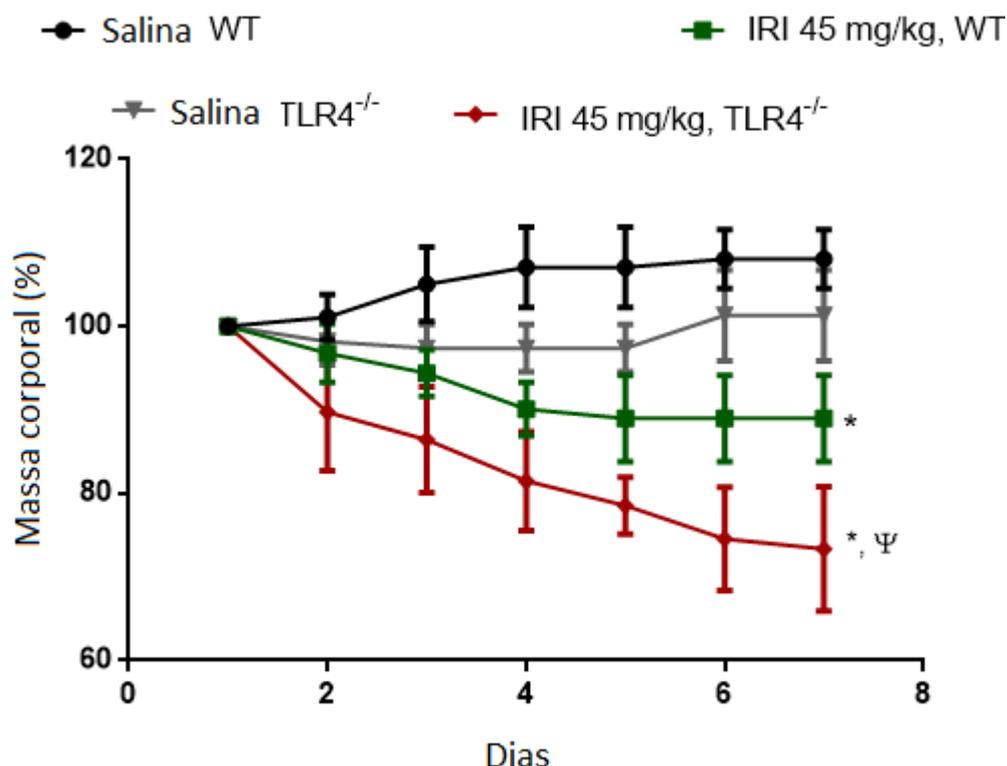
## 5.2 Avaliação dos parâmetros gerais da indução da mucosite intestinal por irinotecano

A mucosite foi induzida através da administração de irinotecano na dose de 45 mg/kg durante 4 dias. Durante esse período, realizou-se a análise da curva ponderal. No sétimo dia após a primeira aplicação de irinotecano, analisou-se a diarreia e os animais foram sacrificados para análise dos parâmetros gerais de mucosite, como análise histopatológica, morfometria intestinal e dosagem de MPO.

Na figura 15, podemos observar que o irinotecano promoveu uma significativa ( $P < 0,05$ ) perda ponderal nos animais selvagens (WT) se comparado com os animais

WT injetados com salina ( $P<0,05$ ). Tal perda ponderal foi ainda mais pronunciada nos animais  $TLR4^{-/-}$  que receberam irinotecano quando comparado aos grupos *knockout* ou WT tratados apenas com salina ou WT injetado com irinotecano ( $P<0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos *knockout* e WT que receberam apenas salina ( $P>0,05$ )

Figura 15 – Efeito da administração de irinotecano sobre a variação ponderal.

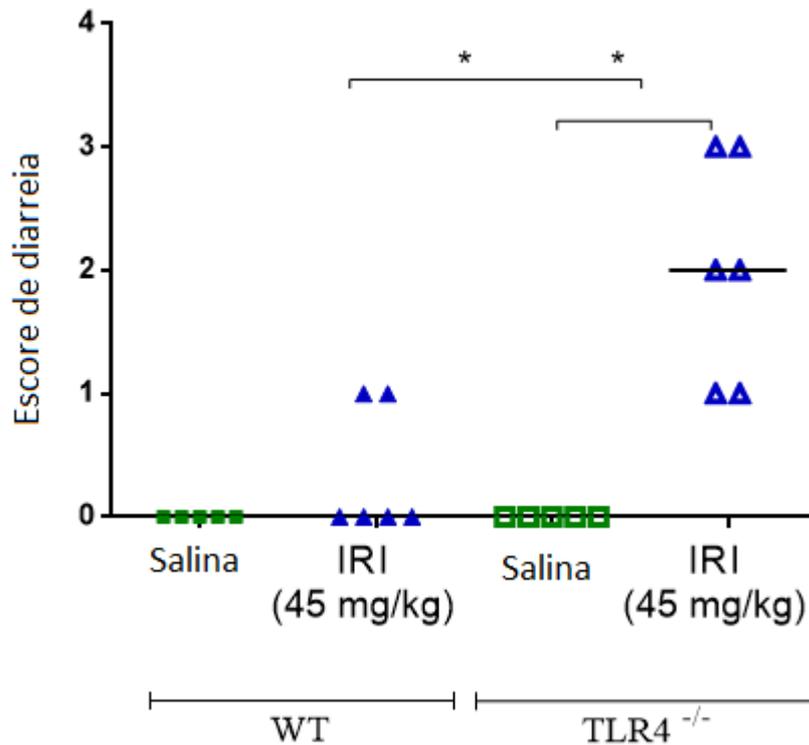


Os animais foram tratados com salina (5 mL/kg i.p) ou irinotecano (45 mg/kg i.p.) durante 4 dias e pesados diariamente até o sétimo dia do experimento. O estudo revela que animais  $TLR4^{-/-}$  injetados com irinotecano apresentaram perda ponderal quando comparados com os animais que receberam apenas salina. Os pontos representam a média  $\pm$  E.P.M da variação percentual de massa corpórea comparado ao peso inicial. Os dados foram analisados pelo teste Two-Way ANOVA. \* $P<0,05$  vs grupo salina WT;  $^{\Psi}P<0,05$  vs grupo WT injetado com irinotecano.

Quanto à análise dos escores de diarreia, observou-se (figura 16) que o irinotecano induz uma significativa ( $P<0,05$ ) diarreia moderada ou grave no sétimo dia

experimental em animais  $TLR4^{-/-}$  quando comparado ao grupo WT tratados com salina ou irinotecano.

Figura 16 – Efeito da administração do irinotecano sobre os escores de diarreia em camundongos C57BL/6.



Os animais foram tratados com salina (5 mL/kg i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg i.p.) durante 4 dias e a diarreia foi avaliada no sétimo dia de experimento. Esta foi avaliada através de escores propostos por Kurita *et al.*, 2000. Pelo gráfico, podemos constatar que animais *knockout* tratados com irinotecano apresentam um aumento na mediana dos escores atribuídos à diarreia quando comparados aos animais WT tratados com salina ou com irinotecano. Os valores representam a mediana e variação dos escores de diarreia. Os dados foram analisados pelo teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn. \* $P < 0,05$ .

Podemos observar que os animais que receberam irinotecano apresentaram uma significativa leucopenia quando comparados ao grupo salina (tabela 1).

Tabela 1 – Efeito da administração do irinotecano sobre a contagem de leucócitos em camundongos C57BL/6.

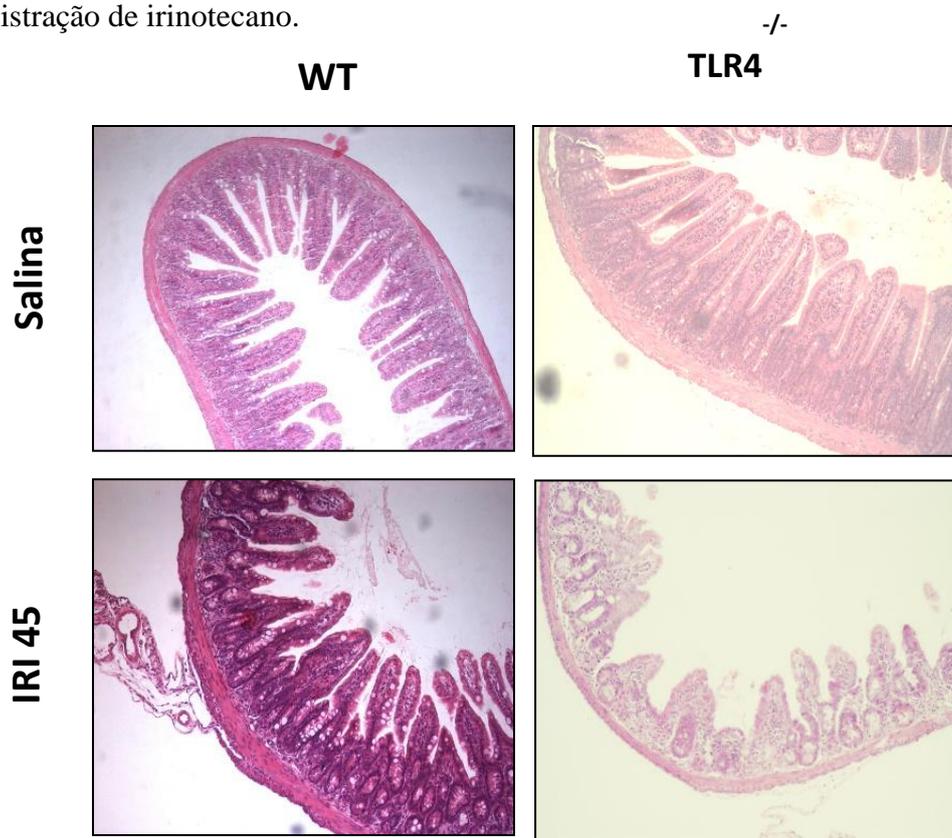
<b>Grupo</b>	<b>Nº de leucócitos (cel. x 10<sup>3</sup> .µL<sup>-1</sup>)</b>
WT + salina	4.825 ± 0.36
WT + Irinotecano 45 mg/kg	2.733 ± 0.15 <sup>a</sup>
TLR4 <sup>-/-</sup> + salina	4.489 ± 0.57
TLR4 <sup>-/-</sup> + Irinotecano 45 mg/kg	3.331 ± 0.45 <sup>b</sup>

Os animais foram tratados com salina (5 mL/kg i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg i.p.) durante 4 dias e eutanasiados no sétimo dia experimental. Amostra de sangue foi coletada do plexo retro-orbital e, em seguida, foi realizada a contagem do número total de leucócitos no contador automático de células – Colter. A tabela apresenta o efeito do Irinotecano em diminuir o número total de leucócitos circulantes. Os valores representam a média ± E.P.M. do número de leucócitos totais por 10<sup>3</sup>/µL. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. <sup>a</sup> P <0,05 vs grupo controle de tipo selvagem injetado com solução salina. <sup>b</sup> P <0,05 versus seu respectivo grupo de controle de nocaute injetado com solução salina.

Após a eutanásia, amostras do intestino foram utilizadas para processamento histopatológico e análise morfométrica. Observou-se que, no sétimo dia de experimento, o irinotecano em animais TLR4<sup>-/-</sup> promoveu uma importante redução ( $P < 0,05$ ) da razão vilosidade/cripta quando comparado aos demais grupos experimentais (figura 17A), o que foi confirmado por escores histopatológicos (Figura 17B e C). Tais escores indicam que houve dano à superfície mucosa quanto à conjuntiva associados a alteração no epitélio e a presença de infiltrado inflamatório.



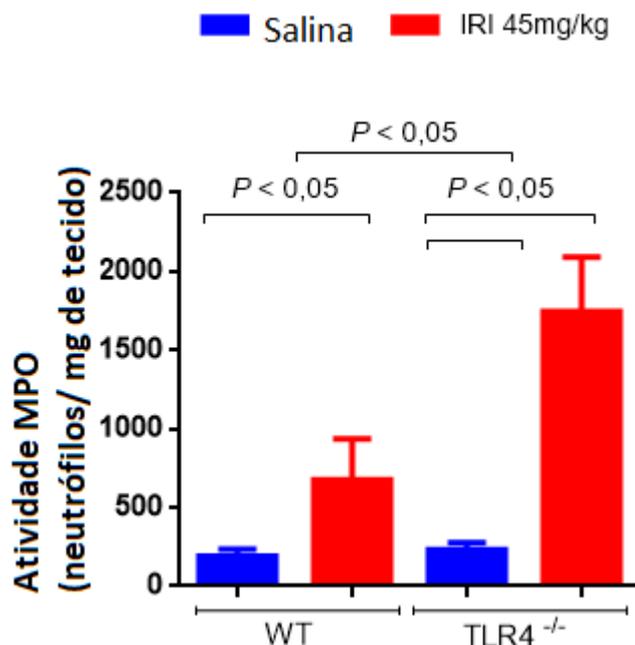
Figura 18 – Fotomicrografia da mucosa intestinal de camundongos C57BL/6 após a administração de irinotecano.



Os animais foram tratados com salina (5 mL/kg i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg i.p.) durante 4 dias e amostras de íleo foram coletadas no sétimo dia experimental para análise histopatológica. Os segmentos intestinais foram removidos e corados pelo método de H&E. Na mucosa dos animais TLR4<sup>-/-</sup> que receberam irinotecano as vilosidades apresentaram-se encurtadas, além de observarem-se vacuolizações de enterócitos e infiltração de neutrófilos. Aumento 100x.

Animais *knockout* para TLR4 que receberam irinotecano apresentaram um aumento significativo do infiltrado neutrofílico em comparação com os demais grupos (figura 19), confirmando o dano inflamatório exacerbado.

Figura 19 – Efeito da administração do irinotecano sobre a infiltração de neutrófilos no intestino de camundongos C57BL/6.



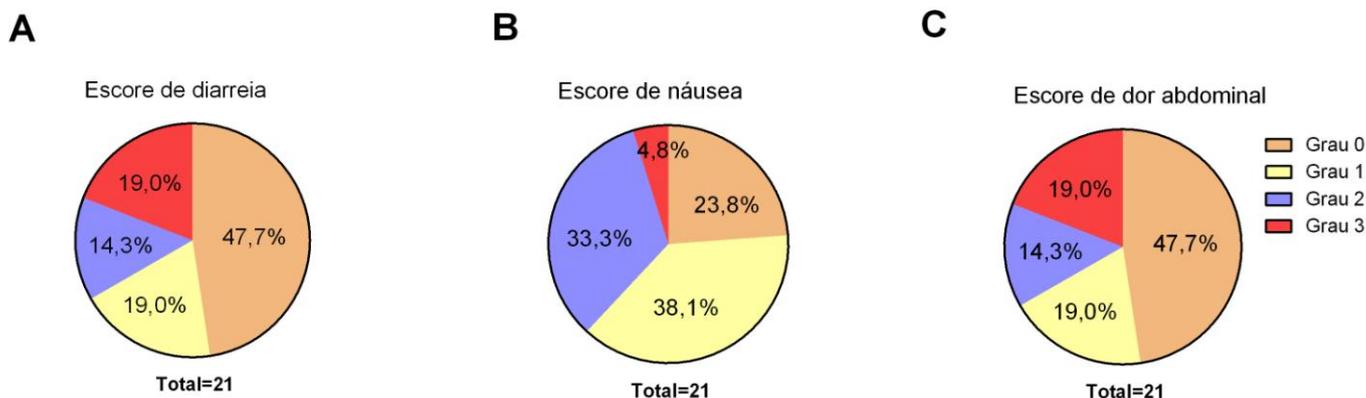
Os animais foram tratados com salina (5 mL/kg i.p.) ou irinotecano (45 mg/kg i.p.) durante 4 dias. A infiltração neutrofílica em amostras de intestino foi analisada no sétimo dia experimental através do ensaio de mieloperoxidase. O gráfico mostra que animais TLR4<sup>-/-</sup> que receberam irinotecano apresentaram aumento na atividade de MPO quando comparados aos demais grupos. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por mg de tecido. A análise estatística foi realizada com o teste One-Way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas estão apresentadas na figura.

### 5.3 Estudo dos polimorfismos em pacientes com câncer de colorretal

O número amostral deste estudo (n) foi igual a 91 indivíduos, onde 21 eram voluntários com CCR (grupo CCR) e 70 eram voluntários sem câncer (grupo controle). A média de idade do grupo CCR foi de 55 anos e a média de idade do grupo controle foi de 32 anos. Quanto ao sexo, foram incluídos nesse estudo 13 indivíduos do sexo feminino (61,9%) e 8 indivíduos do sexo masculino (38,1%) para o grupo CCR. Para o grupo controle, foram incluídos 32 indivíduos do sexo feminino (45,7%) e 38

indivíduos do sexo masculino (54,3%). Nos dois grupos foi realizada a distribuição genotípica e alélica de cada polimorfismo e no grupo CCR foram estudadas ainda variáveis (diarreia, náusea e dor abdominal – figura 20) de acordo com cada polimorfismo.

Figura 20 – Porcentagem geral das variáveis estudadas no grupo CCR.

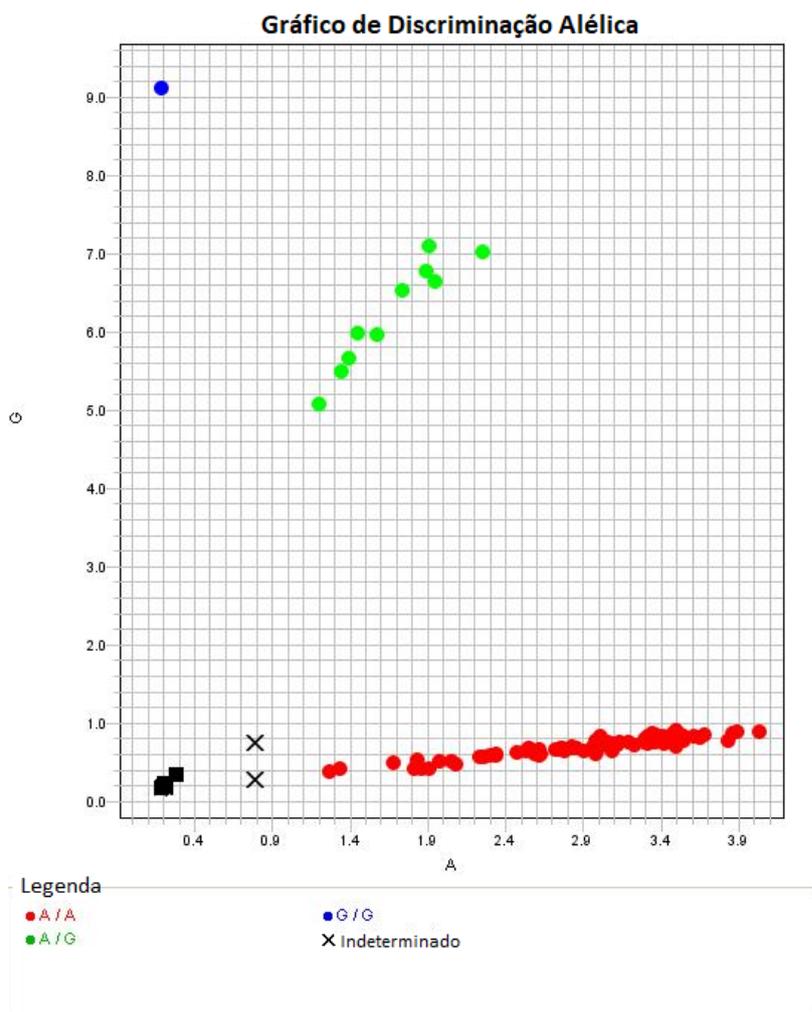


Análise percentual das variáveis estudadas nos pacientes com câncer colorretal em tratamento com irinotecano. (A) Análise dos escores de diarreia. (B) Análise dos escores de náusea. (C) Análise dos escores de dor abdominal.

### 5.3.1 Análise do polimorfismo rs 4986790

A genotipagem do polimorfismo Asp299Gly (figura 21) foi realizada através da técnica de PCR em tempo real no aparelho Fast 7500 (Applied Biosystems®), onde obteve-se a distribuição genotípica e a frequência alélica (tabela 2) do polimorfismo em questão. Não foi possível fazer a genotipagem de dois indivíduos do grupo controle. A discriminação gênica pode não ter ocorrido nessas amostras provavelmente por uma degradação do DNA.

Figura 21 – Genotipagem do polimorfismo Asp299Gly.



Discriminação alélica do polimorfismo rs 4986790 de todos os indivíduos participantes da pesquisa.

Tabela 2 – Frequência alélica, distribuição genotípica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos pacientes e controles para o rs 4986790 do TLR4 para o polimorfismo Asp299Gly dos indivíduos participantes da pesquisa.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		Frequência Gênica			H-W teste	
		A	G	AA	AG	GG	X <sup>2</sup>	p valor
<b>TLR4</b> <b>rs4986790</b>	<b>Controle</b>	126 (92,6%)	10 (7,4%)	58 (85,2%)	10 (14,8%)	00 (0%)	0,42	0,512
	<b>CCR</b>	40 (95,2%)	2 (4,8%)	20 (95,2%)	00 (0%)	1 (4,8%)	21	0,0001

Valor estatisticamente significante para H-W teste é de  $p \geq 0,05$ .

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs 4986790 não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ) nos indivíduos do grupo CCR. Através do teste de qui-quadrado, foi obtida associação significativa entre o grupo controle e o grupo CCR ( $p = 0,032$ ). Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo rs 4986790 do gene TLR4 no grupo CCR com as variáveis diarreia, dor abdominal, e náusea (tabela 3). No intuito de verificar qual genótipo estava associado com o risco da doença, foi realizada a regressão logística multinomial, obtendo-se que o genótipo homocigoto A/A estava associado com a diminuição de risco de CCR ( $p = 0,011$ , OR 4,028E-009, IC 4,886E-010 - 3,321E-008) (tabela 4).

Tabela 3 – Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson para associar a frequência gênica do SNP rs4986790 do gene do TLR4 com as variáveis estudadas.

<b>Variáveis</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Diarreia</b>	1,155	0,764
<b>Náusea</b>	3,360	0,339
<b>Dor abdominal</b>	1,155	0,561

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Tabela 4 – Regressão logística multinomial para associar os genótipos do SNP rs4986790 do gene TLR4 entre o grupo controle e o de pacientes com CCR.

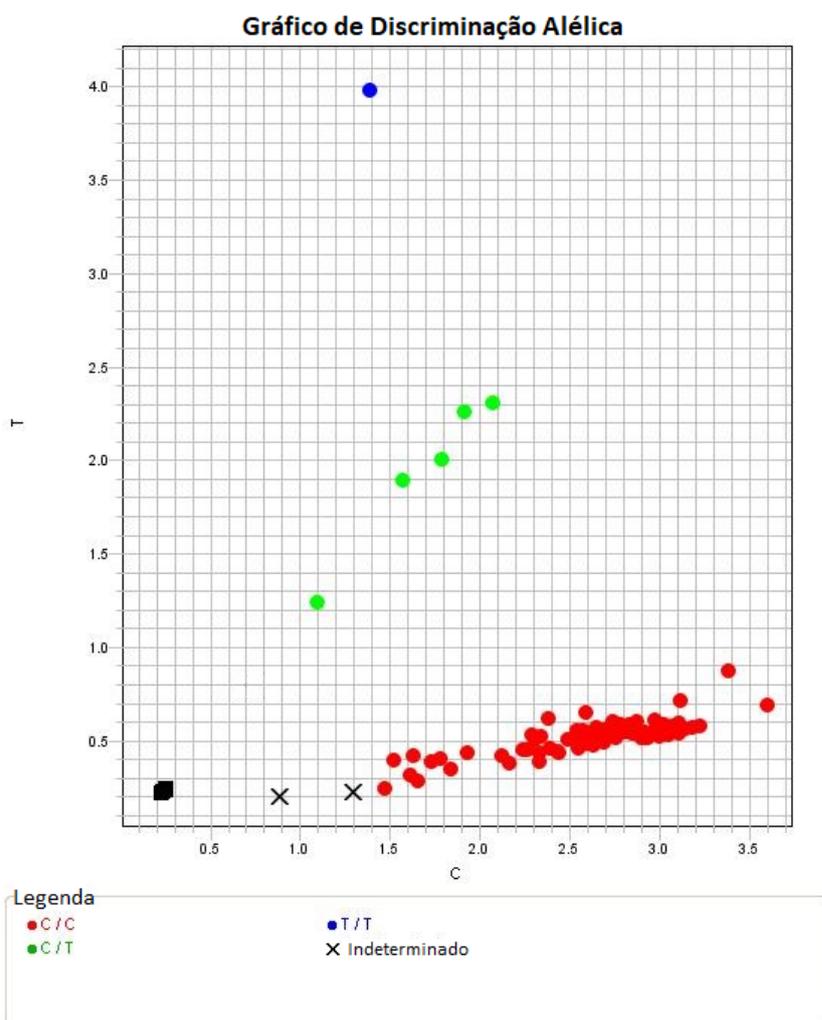
Variáveis		IC 95% para Exp (B)			
Grupos	Genótipo	p valor	Exp (B)	Mínimo	Máximo
Controle	AA				
	AG				
	GG				
CCR	AA	<b>0,011</b>	<b>4,028E-009</b>	<b>4,886E-010</b>	<b>3,321E-008</b>
	AG	0,995			
	GG	0,011	674832619,3	674832619,3	674832619,3

Valor estatisticamente significante para  $p \leq 0,05$  ou  $p \leq 0,001$ .

### 5.3.2 Análise do polimorfismo rs 4986791

A genotipagem do polimorfismo Thr399Ile (figura 22) foi feita através da técnica de PCR em tempo real no aparelho Fast 7500 (Applied Biosystems®), onde obtivemos a distribuição genotípica e a frequência alélica (tabela 5) do polimorfismo em questão. Não foi possível fazer a genotipagem de dois indivíduos do grupo controle. A discriminação gênica pode não ter ocorrido nessas amostras provavelmente por uma degradação do DNA.

Figura 22 – Genotipagem do polimorfismo Thr399Ile.



Discriminação alélica do polimorfismo rs 4986791 de todos os indivíduos participantes da pesquisa.

Tabela 5 – Frequência alélica, distribuição genotípica e equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos pacientes e controles para o rs 4986791 do TLR4 para o polimorfismo Thr399Ile dos indivíduos participantes da pesquisa.

Gene/SNP	Grupo	Frequência Alélica		Frequência Gênica			H-W teste	
		C	T	CC	CT	TT	X <sup>2</sup>	p valor
TLR4 rs4986791	Controle	131 (96,3%)	5 (3,7%)	63 (92,6%)	5 (7,4%)	00 (0%)	0,099	0,753
	CCR	40 (95,2%)	2 (4,8%)	20 (95,2%)	00 (0%)	1 (4,8%)	21	0,0001

Valor estatisticamente significativo para H-W teste é de  $p \geq 0,05$ .

Os genótipos analisados para o polimorfismo rs 4986791 não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.05$ ) nos indivíduos do grupo CCR. Através do teste de qui-quadrado, não foi obtida associação significativa entre o grupo controle e o grupo CCR ( $P = 0,091$ ). Não foram encontradas significâncias nas análises de correlação da frequência genotípica do polimorfismo rs 4986790 do gene TLR4 no grupo CCR com as variáveis diarreia, dor abdominal e náusea (tabela 6). No intuito de verificar qual genótipo estava associado com o risco da doença, foi realizada a regressão logística multinominal, obtendo um  $p = 0,91$ , não podendo assim associar a presença desse polimorfismo com o risco de desenvolvimento do câncer de colorretal.

Tabela 6 – Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson para associar a frequência gênica do SNP rs4986791 do gene do TLR4 com as variáveis estudadas.

<b>Variáveis</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>P</b>
<b>Diarreia</b>	1,155	0,764
<b>Náusea</b>	3,360	0,339
<b>Dor abdominal</b>	1,155	0,561

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, descrevemos que o SN-38, o metabólito ativo do irinotecano, se liga diretamente ao receptor Toll-like 4. A eficácia dos quimioterápicos parece ser parcialmente devida à modulação da função das células imunes do hospedeiro (SHURIN, 2013). Em contrapartida, os agentes antitumorais também promovem respostas pro-inflamatórias que contribuem para os efeitos colaterais (LIMA-JÚNIOR, *et al.* 2014; BAO, *et al.* 2016). Com exemplo, temos que o paclitaxel regula a resposta imune ao atingir o TLR4 (KAWASAKI, 2000) e ativa a cascata de sinalização MyD88-dependente (BYRD-LEIFER, *et al.* 2001). Considerando que, em dados preliminares do laboratório, o irinotecano foi capaz de modular a capacidade do paclitaxel em induzir neuropatia periférica, além do reconhecido envolvimento do MyD88 na mucosite induzida pelo Irinotecano, questionamos se o SN-38 poderia regular o TLR4 com um mecanismo parecido ao do paclitaxel. Através do docking molecular, observamos que o SN-38 ocupou a cavidade hidrofóbica do complexo MD-2/TLR4, responsável pelo reconhecimento de LPS bacteriano. Com isso, detectamos que o SN-38 interage com o TLR4 no mesmo local de ligação ao LPS.

Também demonstramos que a administração de irinotecano foi capaz de induzir uma significativa lesão na mucosa intestinal, com relevante perda do epitélio, sendo observado alterações da arquitetura tecidual com encurtamento das vilosidades, vacuolização e necrose celular das criptas em animais TLR4<sup>-/-</sup>. Verificou-se também que esses animais apresentaram uma significativa perda de peso, um aumento da resposta inflamatória, constatada através da presença de infiltrado de células polimorfonucleares e diarreia.

O dano intestinal induzido pelo irinotecano é um fato bem descrito na literatura (LIMA-JÚNIOR, *et al.* 2012; MELO, *et al.* 2008; LIMA-JÚNIOR, *et al.* 2014; IKUNO, *et al.* 1995), estudos nos quais o irinotecano leva a uma perda acentuada do revestimento celular epitelial, encurtamento das vilosidades, expressão de mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-1beta, interleucina-18, óxido nítrico, além da presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria.

Uma das manifestações mais comuns associada ao uso da quimioterapia é a diarreia (ARNOLD, *et al.* 2005). A diarreia associada ao irinotecano é classificada em duas fases, uma inicial que ocorre em 43 a 51% dos pacientes, dentre os quais 7 a 22% desses pacientes são classificados com grau elevado e a fase tardia, onde a diarreia

ocorre em cerca de 83 a 88% dos pacientes, onde 14 a 31% estão nos grau 3 a 4 (KRISHNAMURTHI; DREWS; SAVARESE, 2013). Experimentalmente, a diarreia induzida por irinotecano é reproduzida em trabalhos de nosso grupo em que se utilizaram camundongos. Nesse contexto, a administração intraperitoneal de 75 mg/kg de irinotecano por 4 dias consecutivos induz uma grave mucosite marcada por uma importante diarreia de grau moderado a intenso a partir do quinto dia de experimento (WONG, *et al.* 2015; LIMA-JÚNIOR, *et al.* 2008).

Contudo, dados obtidos em outros estudos de nosso laboratório indicam que a dose de 45 mg/kg de irinotecano é considerada, na verdade, uma sub-dose que não acarreta mucosite intestinal, demonstrado através de um modelo experimental utilizando diferentes doses de administração de irinotecano isolado ou associado com 5-FU em camundongos (PEREIRA, *et al.* 2016). Com isso, torna-se relevante estudar a patogênese da mucosite intestinal a partir de um modelo experimental, onde a diarreia é utilizada como uma manifestação clínica de acompanhamento do estabelecimento da doença e marcadora da lesão inflamatória que acomete a mucosa intestinal.

Os resultados aqui apresentados, utilizando um modelo murino com administração diária de 45 mg/kg de irinotecano por 4 dias via intraperitoneal, mostraram que animais  $TL4^{-/-}$  tratados com irinotecano apresentaram uma significativa diarreia quando comparados aos animais  $TLR4^{-/-}$  tratados com salina ou mesmo com animais WT que receberam irinotecano. Esse achado sugere que a deleção genética para receptores TLR4 induz um agravo da mucosite.

Um estudo realizado em animais por Nakao, *et al.* 2012, sugere que o irinotecano causa danos as proteínas claudina-1 e ocludina, gerando alterações na barreira epitelial intestinal, permitindo uma translocação bacteriana que por sua vez pode contribuir para um agravo da mucosite.

O lúmen intestinal constitui uma grande fonte de LPS bacteriano, onde este é um estímulo fundamental para a ativação celular residente na lâmina própria (SIMIANTOMAKI; JAYSUBGHE; KIRKPATRICK, 2002). Achados do nosso laboratório indicam que a administração de irinotecano em camundongos leva a um aumento da translocação bacteriana para órgãos estéreis, com identificação bioquímica de bacilos gram-negativos no fígado e no linfonodo mesentérico. Adicionalmente a isso, achados na literatura demonstram que pacientes em uso de quimioterapia apresentam um crescimento de Enterobactérias (STRINGER, *et al.* 2009; RAM, *et al.* 2012) durante o câncer colorretal (AZCÁRATE-PERIL, *et al.* 2011; WANG, *et al.* 2012) e na colite

(LUPP, *et al.* 2007; DE SOUZA, *et al.* 2012), como consequência de uma alteração funcional e do sistema imunológico intestinal.

De forma interessante, a deleção genética para receptores TLR2 e TLR9 contribuiu para a redução global da mucosite (deleção de TLR2 somente) ou controle somente da diarreia (deleção para TLR9) (WONG *et al.*, 2015), indicando que cada receptor TLR contribui de forma diferencial para os mecanismos patogênicos da mucosite induzida por quimioterapia.

Levando em consideração que o irinotecano tem a capacidade de modificar o equilíbrio da microbiota intestinal, contribuindo para o desenvolvimento da mucosite intestinal e que a proteína adaptadora MyD88 tem um importante papel sinalizador para receptores reconhecedores dessas bactérias, nosso grupo de pesquisa, realizou um experimento utilizando animais com deleção gênica para MyD88 e tratados com irinotecano 75 mg/kg, ip. por 4 dias. Constatou-se que esses animais tiveram uma melhor sobrevivência, apresentaram uma diminuição dos eventos de diarreia e ainda uma menor bacteremia quando comparados à camundongos selvagens tratados com irinotecano. Esses dados indicam que a proteína adaptadora MyD88 contribui de maneira prejudicial na patogênese da mucosite intestinal. Sendo esta proteína um sinalizador celular importante de TLR2, 4 e 9 (WONG, *et al.* 2015), optamos por avaliar o papel de receptores TLR4 na patogênese da mucosite.

Um dos principais motivos para a realização desse estudo foram os achados iniciais de uma pesquisa realizada em nosso laboratório, onde foi encontrado um aumento da imunomarcagem do receptor TLR4 por análise imunistoquímica em amostras intestinais de animais selvagens tratados com Irinotecano, sugerindo que exista uma correlação entre o processo inflamatório e a ativação do TLR4.

No nosso estudo, fica claro que o sistema imune dos animais *knockout* para TLR4 não foi capaz de impedir o desenvolvimento de uma mucosite. Pelo contrário, agravou o dano intestinal, o que indica que este receptor é fundamental para o retardamento do desenvolvimento da mucosite, uma vez que ele age na ativação de NF- $\kappa$ B, que por sua vez estimula a produção de citocinas importantes no reconhecimento e combate às bactérias em translocação. O controle da sinalização basal de TLR4 no intestino, portanto, é essencial para manter a homeostase intestinal (CARIO, 2016).

Entretanto, uma ativação excessiva de TLRs, como o TLR2 e TLR9, contribui para uma produção exacerbada de citocinas de tal maneira que estas podem estar associadas ao desenvolvimento e gravidade da mucosite, uma vez que a modulação

destes mediadores inibe o curso da mucosite (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2014; WONG *et al.*, 2015). Em nossa percepção, o papel de diferentes receptores TLR no curso da mucosite deve ser melhor compreendido. Ao que parece, a ativação de TLR4 sinaliza, em um momento inicial, para o efetivo combate às infecções, por reconhecer o patógeno, enquanto o TLR2 e TLR9 contribuiriam para a amplificação da sinalização e, conseqüentemente, a geração do dano.

O binômio inflamação-câncer é algo bem estabelecido na literatura (WANG, KARIN, 2015). Foi demonstrado que a sinalização diminuída dos receptores da imunidade inata pode ser um importante fator patogênico no desenvolvimento de inflamações intestinais (PODOLSKY, 2002), incluindo a mucosite e ainda interferir na patogênese do câncer. Com isso, uma redução na função dos TLRs pode estar associada com um aumento do risco de câncer (AHMED; WANG; REDMOND, 2013). Contudo, o papel de TLRs na carcinogênese ainda é incerto.

No intuito de verificar se o receptor Toll-like 4 também possa estar associado à patogênese da mucosite intestinal em humanos, resolvemos estudar se os polimorfismos funcionais desse receptor são capazes alterar a frequência de toxicidades gastrointestinais em pacientes com câncer de colorretal fazendo o uso de irinotecano. Tal hipótese levou em consideração a exacerbação de eventos de diarreia e agravo da mucosite em animais com deleção gênica para o TLR4.

O TLR4 possui dois polimorfismos e mais investigados são Asp299Gly (rs4986790) e Thr399Ile (rs4986791), onde a substituição do aminoácido no Asp299Gly afeta a região extracelular desse receptor, podendo acarretar uma diminuição do reconhecimento ou interação de proteína e ainda uma diminuição da responsividade ao LPS (ARBOUR, *et al.* 2000). Como consequência a essa mudança, a ativação de TLR4 pode ser afetada, levando a uma resposta inflamatória exagerada e proporcionando uma grave lesão tecidual (ZHU, *et al.* 2013).

De modo geral, mais da metade dos pacientes CCR recrutados nesse estudo (52,3%) apresentaram algum grau de diarreia, onde também vimos que a grande maioria dos pacientes CCR relataram a presença de náusea (76,2%) e dor abdominal (52,3%), confirmando o poder de toxicidade do irinotecano.

Dados na literatura mostram que pacientes em tratamento com irinotecano apresentam uma mudança no perfil de bactérias intestinais, onde a diarreia provocada pelo uso desse quimioterápico pode ser originada pelo aumento populacional de bactérias, como *Escherichia coli*, que são produtoras de beta-glicuronidades no

intestino. Estas bactérias são capazes de clivar o grupamento glicuronídeo acoplado ao irinotecano eliminado por via biliar, levando a uma reativação do quimioterápico e prolongando o tempo de meia-vida do fármaco (STRINGER, *et al.* 2008). Essas bactérias apresentam ligantes (LPS) para o receptor TLR4, que poderiam ativar um processo inflamatório intestinal e contribuir para a lesão observada na mucosite.

De maneira curiosa, o uso de probióticos ocorre tanto na prevenção de tumores quanto na regulação da microbiota intestinal, sendo ainda eficaz como uma terapia auxiliar no tratamento de pacientes com CCR, pois ajudam a reduzir os quadros diarreicos causados pelo irinotecano, porém seu uso não é indicado naqueles pacientes imunossuprimidos (AC CAMARGO, 2017). Assim, tanto a microbiota intestinal quanto os polimorfismos genéticos podem influenciar na capacidade da toxicidade intestinal induzida pelo irinotecano, sendo estas e outras potenciais variáveis as possíveis explicações para a não associação dentro do presente estudo.

Não se conseguiu correlacionar a mucosite intestinal com a presença do polimorfismo em pacientes com CCR que fazem o uso de irinotecano. Possivelmente, isso tenha ocorrido devido ao baixo número de pacientes participantes da pesquisa nesse estudo. De forma interessante, os SNPs na região promotora desse receptor têm sido associados ao aumento de doenças infecciosas e inflamatórias, tais como sepse (LORENZ, *et al.* 2002), candidíase (VAN DER GRAFF, *et al.* 2006), colite ulcerativa (SHEN, *et al.* 2010), doença de Crohn (HUME, *et al.* 2008; SHEN, *et al.* 2010) e outras doenças inflamatórias intestinais (FRANCHIMONT, *et al.* 2004), tendo ainda um impacto na homeostase intestinal, podendo levar a uma inflamação crônica (DAVOODI; HASHEMI; SEOW, 2012).

Sabe-se que o TLR4 é expresso em células tumorais, como no câncer colorretal, onde esse alto nível de expressão ocorre principalmente devido às infecções por bactérias gram-negativas no cólon, levando a uma indução da produção de citocinas pró-inflamatórias (SEMLALI, *et al.* 2016). Em condições normais, as células da barreira epitelial intestinal expressam pouco TLR4 e em caso de doenças inflamatórias e infecciosas, o seu nível de expressão é aumentado (CARIO; PODOLSKY, 2000; CARIO, *et al.* 2006).

De forma interessante, demonstramos que o polimorfismo Asp299Gly pode estar relacionado com o aumento do risco de o paciente desenvolver câncer colorretal, onde pacientes que apresentaram o genótipo homocigoto selvagem (A/A) tem um menor risco de desenvolver a doença quando comparados com aqueles que apresentam o

genótipo homozigoto mutante (G/G). Esse dado ainda é incerto na literatura, porém, uma revisão realizada em 2015, analisou nove estudos, com o total de 1198 pacientes com CCR e 1290 voluntários saudáveis, constatando que portadores do genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo Asp299Gly podem estar correlacionados com um risco aumentado de desenvolver CCR, sugerindo que esse alelo mutante pode servir como fatores de risco genético para CCR (SHENG, *et al.* 2015).

O TLR4 pode desempenhar um papel importante no controle da metástase, através da ativação de múltiplas moléculas sinalizadoras, dentre elas o NF-kB, que induz a transcrição dos genes codificando citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (BARNES; KARIN, 1997). Porém, o *up-regulation* do TLR4 pode ser correlacionada com o aumento da metástase no câncer de próstata e ainda com o grau do tumor no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HUA, *et al.* 2009; SZCZEPANSKI, *et al.* 2009). Assim, o efeito do TLR4 na progressão do câncer e na metástase vai depender do nível de sua expressão e de sua localização, se no microambiente ou na célula tumoral (WANG, KARIN, 2015).

Já é claro que a presença do TLR4 nas células imunes impede a progressão do tumor e metástase. No entanto, a presença desse receptor em células tumorais pode promover a metástase. Isso foi revelado através de análises funcionais que constataram que a ausência do TLR4 em células tumorais leva uma redução na capacidade metastática dessas células para os pulmões (AHMED; WANG; REDMOND, 2013). Por outro lado, a ausência do TLR4 em células imunes leva um aumento significativo do crescimento tumoral. Assim, o TLR4 pode desempenhar funções opostas quando expresso em células tumorais e células imunes (AHMED; WANG; REDMOND, 2013). Outro estudo demonstra que a expressão reduzida de TLR4 tem sido associada com o aumento do potencial metastático do câncer de colorretal (SIMIANTONAKI, *et al.* 2007).

Um experimento realizado com camundongos mostrou que os animais que não apresentavam o TLR4 ou que possuíam um alelo polimórfico do TLR4 não conseguiram estabelecer uma resposta imunológica contra células tumorais tratadas com antraciclinas e, ainda, os tumores que proliferaram em camundongos deficientes de TLR4 tiveram uma resposta refratária à quimioterapia (APETOH, *et al.* 2007).

Quando ocorre uma desregulação da sinalização de TLR4 devido à presença de polimorfismos de nucleotídeo único, pode ocorrer uma alteração na ligação do ligante e

na produção de citocinas pró-inflamatórias, modulando assim o risco de inflamação crônica e até mesmo câncer (KUTIKHIN, 2011).

Um estudo realizado em 2011 por Eyking e colaboradores, mostrou que células Caco-2 que sofreram transfecção do TLR4 com o polimorfismo Asp299Gly apresentaram um aumento significativo nos níveis de expressão do gene e nas proteínas associadas à inflamação e tumorigênese quando comparadas com as células transfectadas com TLR4 selvagem. Conclui-se que esse polimorfismo é capaz de induzir a progressão neoplásica em células Caco-2 e ainda pode ser associado CCR mais agressivo em humanos.

Na literatura, existem achados controversos quanto ao risco de desenvolvimento de câncer e a presença desses polimorfismos. Estudos apontam que existe uma baixa incidência dos polimorfismos Asp299Gly e Thr399Ile em pacientes asiáticos (LIN, *et al.* 2005; OKAYAMA, *et al.* 2002), não podendo então correlacionar a presença do polimorfismo com o risco de desenvolvimento de câncer de colorretal naquela população (DAVOODI; SEOW, 2011), nem em indianos (NISSAR, *et al.* 2017). Ainda, de acordo com Omrane e colaboradores, não foram encontradas evidências que mostrem uma associação desses polimorfismos e a susceptibilidade ao CCR na população tunisiana, porém, os mesmos podem estar associados as variáveis clínicas, como diferenciação e arquitetura tumoral.

Por outro lado, resultados mostram que a detecção do polimorfismo Asp299Gly está correlacionado com o risco aumento de 4 vezes para o desenvolver câncer de próstata na população indiana (PRIYADARSHINI, *et al.* 2013). Entretanto, uma meta análise sugeriu que o Asp299Gly apresenta um efeito protetor no câncer de próstata, enquanto esse polimorfismo e o Thr399Ile estão associados ao risco elevado de câncer gastrointestinal (JING; LI; YUAN, 2012; SHENG, *et al.* 2015).

Outro estudo sugeriu uma forte evidência da associação entres os polimorfismos do TLR4 e o CCR, indicando que esses polimorfismos poderiam ser utilizados como biomarcadores para escolha no tratamento desse tipo de câncer (SEMLAIL, *et al.* 2016). De forma complementar, realizou-se uma avaliação na população caucasiana, onde se concluiu que pacientes homozigotos para o polimorfismo Asp299Gly tem um risco aumentado de desenvolver câncer de colorretal (NUNES, *et al.* 2013).

Nossos resultados vão ao encontro ao esses pesquisadores que correlacionam a presença do polimorfismo com o risco de desenvolver a doença, pois sugerimos que a presença do polimorfismo Asp299Gly pode ser correlacionado ao desenvolvimento do

câncer. Resultados parecidos tiveram autores que estudaram a presença desses polimorfismos com associação do desenvolvimento e prognóstico do CCR (MESSARITAKIS, *et al.* 2018).

Assim, uma abordagem experimental, como a aqui realizada, que sugere que receptores TLR4 são importantes fatores protetores contra a toxicidade da quimioterapia, aliados aos achados clínicos, que sugeriram uma associação de polimorfismos desses mesmos receptores com o desenvolvimento de câncer colorretal, apresentam em conjunto a importância de se compreender com maior profundidade como o sistema imunológico pode contribuir no prognóstico dos pacientes.

## 7 CONCLUSÕES

- ✓ O receptor toll-like 4 é de extrema importância para definir o curso da mucosite, pois o mesmo é essencial para manter a homeostase intestinal, de tal maneira que a sua ausência pode desencadear em danos intestinais mediado pelo irinotecano.
  
- ✓ Ainda não podemos sugerir uma possível correlação do polimorfismo Asp299Gly do TLR4 com um maior risco de desenvolvimento de CCR.

## REFERÊNCIAS

AC CARMARGO. **Releases.** Disponível em: <http://www.accamargo.org.br/releases/uso-de-omega-3-probioticos-e-glutamina-em-pacientes-oncologicos-e-pauta-em-painel-de-nutricao-de-congresso-promovido-pelo-accamargo-cancer-center/316/>. Acesso em 25 de jul de 2018.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, p. 782–7, 2000.

AHMED, A.; WANG, J. H.; REDMOND, H. P. Silencing of TLR4 Increases Tumor Progression and Lung Metastasis in a Murine Model of Breast Cancer. **Ann Surg Oncol**, v. 20, p. 389–396, 2013.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124(4), p. 783-801, 2006.

ALVES-FILHO, J. C.; FREITAS, A.; RUSSO, M. *et al.* Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**, v. 34(2), p. 461-70, 2006.

ANDRWS, E. J.; WANG, J. H.; WINTER, D. C. *et al.* Tumor cell adhesion to endothelial cells is increased by endotoxin via an upregulation of b-1 integrin expression. **J Surg Res**, v. 97, p. 14– 19, 2001.

APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; TESNIERE, A. *et al.* Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nature Medicine**, v. 13 (9), p. 1050-1059, 2007.

ARBOUR, N. C.; LORENZ, E.; SCHUTTE, B. C. *et al.* *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature Genetics**, v. 25, p. 187-191, 2000.

AWASTHI, S. Toll-Like Receptor-4 Modulation for Cancer Immunotherapy. **Front Immunol**, v. 5, p. 328, 2014.

BAO, T.; BASAL, C.; SELUZICKI, C. *et al.* Long-term chemotherapy-induced peripheral neuropathy among breast cancer survivors: prevalence, risk factors, and fall risk. **Breast Cancer Res Treat**, v. 159(2), p. 327-33, 2016.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med**, v. 336, p. 1066-1071, 1997.

BERGMANN, C.; BACHMANN, H. S.; BANKFALVI, A. *et al.* Toll-like receptor 4 single-nucleotide polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in head and neck squamous cell carcinomas. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p.139, 2011.

BOSSI, P.; LUCCHESI, M.; ANTONUZZO, A. Gastrointestinal toxicities from targeted therapies: measurement, duration and impact. **Curr Opin Support Palliat Care**. v. 9, p163-7, 2015.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999.

BYRD-LEIFER, C. A.; BLOCK, E. F.; TAKEDA, K. *et al.* The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. **Eur J Immunol**, v. 31(8), p. 2448-57, 2001.

CARIO, E.; PODOLSKY, D. K. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. **Infect Immun**, v. 68, p. 7010–7017, 2000.

CARIO, E.; GOLENBOCK, D. T.; VISINTIN, A. *et al.* Trypsin-sensitive modulation of intestinal epithelial MD-2 as mechanism of lipopolysaccharide tolerance. **J Immunol**, v. 176, p.4258–4266, 2006.

CARIO, E. Toll-like receptors in the pathogenesis of chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 10(2), p. 157-64, 2016.

CASSEL, S. L.; EISENBARTH, S. C.; IYER, S. S. *et al.* The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.105, p.9035-9040, 2008.

DAVOODI, H.; HASHEMI, S. R.; SEOW, H. F. Increased NFκ-B Activity in HCT116 Colorectal Cancer Cell Line Harboring TLR4 Asp299Gly Variant. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 11(2), p. 121-132, 2012.

DAVOODI, H.; SEOW, H. F. Variant Toll-like receptor4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer. **Iran J Allergy Asthma Immunol**, v. 10(2), p. 91-9, 2011.

DOUILLARD, J. Y.; CUNNINGHAM, D.; ROTH, A. D. *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. **Lancet**, v. 355, p. 1041-1047, 2000.

EDGE, S. B.; BYRD, D. R.; COMPTON, C. C. *et al.* **AJCC cancer staging manual**. 7 ed. New York: Springer-Verlag, 2010.

EFFERTH, T.; VOLM, M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. **Pharmacol. Therap.**, v. 107, p. 155-176, 2005.

EYKING, A.; EY, B.; RUNZI, M. *et al.* Toll-like receptor 4 variant D299G induces features of neoplastic progression in Caco-2 intestinal cells and is associated with advanced human colon cancer. **Gastroenterology**. v. 141(6), p. 2154-65, 2011.

FRANCHIMONT, D.; VERMEIRE, S.; EL HOUSNI, H. *et al.* Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly

polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, v. 53, p.987–992, 2004.

FRANK, M.; HENNENBERG, E. M.; EYKING, A. *et al.* TLR signaling modulates side effects of anticancer therapy in the small intestine. **J Immunol**, v. 194 (4), p. 1983-95, 2015.

FUCHS, C. S.; MARSHALL, J.; BARRUECO J. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: updated results from the BICC-C study. **J Clin Oncol**, v. 26, p. 689-90, 2008.

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.

FUKATA, M.; CHEN, A.; VAMADEVAN, A. S. *et al.* Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. **Gastroenterology**, v. 133, p. 1869–1881, 2007.

GUPTA, E.; LESTINGI, T. M.; MICK, R. *et al.* Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. **Cancer Research**, v. 54, p. 3723-3725, 1994.

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

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, p. 646- 674, 2011.

HOLLEGAARD, M.V.; BIDWELL, J. L. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. **Genes and Immunity**, v. 7, p. 269–276, 2006.

HUA, D.; LIU, M. Y.; CHENG, Z. D. *et al.* Small interfering RNA-directed targeting of Toll-like receptor 4 inhibits human prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity. **Mol Immunol**, v. 46, p.2876–84, 2009.

HUME, G. E.; FOWLER, E. V.; DOECKE, J. *et al.* Novel NOD2 haplotype strengthens the association between TLR4 Asp299gly and Crohn's disease in an Australian population. **Inflamm Bowel Dis**, v. 14, p. 585–590, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). Estimativa 2018: Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**; 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER (Brasil). **Colorretal**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao> ++. Acesso em: 16 jan 2018.

IKUNO, N.; SODA, H.; WATANABE, M. *et al.* Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and caecum. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 1876–1883, 1995.

JING, J. J.; LI, M.; YUAN, Y. Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in cancer: a meta-analysis. **Gene**, v. 499(2), p. 237-42, 2012.

KACZMAREK, A.; BRINKMAN, B. M.; HEYNDRICKX, L. *et al.* Severity of doxorubicin-induced small intestinal mucositis is regulated by the TLR-2 and TLR-9 pathways. **J Pathol**, v. 226 (4), p. 598-608, 2012.

KAWAGOE, T.; SATO, S.; MATSUSHITA, K. *et al.* Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. **Nat. Immunol**, v. 9, p. 684–691, 2008.

KAWASAKI, K.; AKASHI, S.; SHIMAZU, R. *et al.* Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. **J Biol Chem**, v. 275(4), p.2251-4, 2000.

KEEFE, D. M.; ELTING, L. S.; NGUYEN, H. T. *et al.* Risk and outcomes of chemotherapy-induced diarrhea (CID) among patients with colorectal cancer receiving multi-cycle chemotherapy. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 74, p. 675-680, 2014.

KEMENY, N. SEITER, K. Colon and rectal carcinoma. In: Droz JP, Cvitkovic E, Armand JP, Krouy S, editors. **Handbook of chemotherapy in clinical oncology**. London: SCI Ltd; p.589-94,1993.

KINANE, D. F.; HART, T. C. Genes and genes polymorphisms associated with periodontal disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, p. 430-449, 2003.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N. *et al.* Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 26, p. 211-220, 2000.

KUTIKHIN, A. G. Impact of Toll-like receptor 4 polymorphisms on risk of cancer. **Human Immunology**, v. 72, p. 193–206, 2011.

LALLA, R. V.; BOWEN, J.; BARASCH, A. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Mucositis Secondary to Cancer Therapy. **Cancer**, p. 1453-1461, 2014.

LEAL, F. L.; FERREIRA, F. P.; SASSE, A. D. FOLFOXIRI. Regimen for metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Colorectal Cancer**. DOI:10.1016/j.clcc.2017.03.012, 2017.

LI, L.; YANG, L.; ZHANG, Y.; XU, Z.; QIN, T.; HAO, Y.; XIAO, Z. Detoxification and DNA repair genes polymorphisms and susceptibility of primary myelodysplastic syndromes in Chinese population. **Leuk. Res.**, v. 35, n. 6, p. 762-765, 2011.

LIN Y. C.; CHANGA, Y. M.; YUA, J. M. *et al.* Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. **Atherosclerosis**, v. 180, p. 305–309, 2005.

LIMA-JÚNIOR RC, FIGUEIREDO AA, FREITAS HC. *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.69, p.931-942, 2012.

LIMA-JÚNIOR, R. C.; FREITAS, H. C.; WONG, D. V. *et al.* Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, p. 2335-2350, 2014.

LORENZ, E.; HALLMAN, M.; MARTTILA, R. *et al.* Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. **Pediatr Res**, v. 52, p.373–376, 2002.

LUPP, C.; ROBERTSON, M. L.; WICKHAM, M. E. *et al.* Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. **Cell Host Microbe**, v. 16(2), p. 119-29, 2007.

MARTINO, E.; VOLPE, S. D.; TERRIBLE, E. *et al.* The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.27, p.701-707, 2017.

MELO, M. L.; BRITO, G. A.; SOARES, R. C. *et al.* 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 Chemotherapy Pharmacology**, v. 61, p. 775-784, 2008.

MESSARITAKIS, I.; STOGIANNITSI, M.; KOULOURIDI, A. *et al.* Evaluation of the detection of Toll-like receptors (TLRs) in cancer development and progression in patients with colorectal cancer. **PLoS ONE**, DOI: 10.1371/journal.pone.0197327, 2018.

MOHRENWEISER, H. W.; WILSON, D. M.; JONES, I. M. Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. **Mutat. Res.**, v. 526, p. 93-125, 2003.

NAKAO, T.; KURITA, N.; KOMATSU, M. *et al.* Irinotecan injures tight junction and causes bacterial translocation in rat. **J Surg Res**, v. 173, p. 341–7, 2012.

NISSAR, S.; SAMEER, A. S.; RASOOL, R. *et al.* Role of TLR4 gene polymorphisms in the colorectal cancer risk modulation in ethnic Kashmiri population – A case–control study. **The Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 18, p. 53–59, 2017.

NUNES, P. P.; TEIXEIRA, A. L.; PEREIRA, C. *et al.* Functional polymorphisms of Toll-like receptors 2 and 4 alter the risk for colorectal carcinoma in Europeans. **Digestive and Liver Disease**, v. 45, p. 63– 69, 2013.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H.F. *et al.* **Thompson & Thompson Genética Médica**. 7ed, Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

OKAYAMA, N.; FUJIMURA, K.; SUEHIRO, Y. *et al.* Simple Genotype Analysis of the Asp299Gly Polymorphism of the Toll-Like Receptor-4 Gene That is Associated With Lipopolysaccharide Hyporesponsiveness. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, p. 56–58, 2002.

OPAL, S. M.; ESMON, C. T. Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. **Crit Care**, v. 7, p. 23–38, 2003.

OMRANE, I.; BAROUDI, O.; KOURDA, N. *et al.* Positive link between variant Toll-like receptor 4 (Asp299Gly and Thr399Ile) and colorectal cancer patients with advanced stage and lymph node metastasis. **Tumor Biol**, v. 35, p. 545–551, 2014.

PEREIRA, V. B. M.; MELO, A. T.; ASSIS-JUNIOR, E. M. *et al.* A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 77, p. 323–332, 2016.

PODOLSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 347, p. 417-429, 2002.

PRIYADARSHINI, A.; CHAKRABORTI, A.; MANDAL, A. K. *et al.* Asp299Gly and Thr399Ile polymorphism of TLR-4 gene in patients with prostate cancer from North India. **Indian J Urol**. v. 29(1), p.37-41, 2013.

RABBA, A. K.; SI, L.; XUE, K. *et al.* *In Situ* Intestinal Perfusion of Irinotecan: Application to P-gp Mediated Drug Interaction and Introduction of an Improved HPLC Assay. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v 14(2), p. 138 - 147, 2011.

RALLABHANDI, P.; BELL, J.; BOUKHVALOVA, M. S. *et al.* Analysis of TLR4 polymorphic variants: New insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure and signaling. **J Immunol**, v. 177, p. 322–32, 2006.

RAM, R.; FARBMAN, L.; LEIBOVICI, L. *et al.* Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalised haemato-oncological patients. **Int J Antimicrob Agents**, v. 40(2), p. 123-6, 2012.

RIBEIRO, R. A.; WANDERLEY, C. W.; WONG, D. V. *et al.* Irinotecan- and 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 78, p. 881-893, 2016.

RIVORY, L. P.; BOWLES, M. R.; ROBERT, J. *et al.* Conversion of Irinotecan (CPT-11) to Its Active Metabolite, 7-Ethyl-10 $\alpha$ -hydroxycamptothecin (SN-38), by Human Liver Carboxylesterase. **Biochemical Pharmacology**. v. 52, p. 1103-1111, 1996.

SALTZ, L. B.; COX, J. V.; BLANKE, C. *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. **N Engl J Med**; v. 343, p. 905-14, 2000.

SATO, T.; HATATE, K.; IKEDA, A. *et al.* Treatment of advanced or recurrent colorectal cancer with irinotecan in Japan and elsewhere. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 9, p. 1223-1228, 2008.

SCHRÖDER, N. W.; SCHUMANN, R. R. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease. **Lancet Infect Dis**, v.5(3), p.156-64, 2005.

SEMLALI, A.; PARINE, N. R.; ARAFAH, M. Expression and Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 and Effect on NF- $\kappa$ B Mediated Inflammation in Colon Cancer Patients. **PLoS ONE**, DOI: 10.1371/journal.pone.0146333, 2016.

SHEN, X.; SHI, R.; ZHANG, H. *et al.* The Toll like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: a meta-analysis. **Digestion**, v. 81, p. 69–77, 2010.

SHENG, W. Y.; YONG, Z.; Yun, Z. *et al.* Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer: a meta-analysis and review. **Arch Med Sci**, v. 11 (4), p. 699–707, 2015.

SHURIN, M. R. Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy. **Nat Med**, v. 19(1), p. 20–22, 2013.

SIMIANTONAKI, N.; KURZIK-DUMKE, U.; KARYOFYLLI, G. *et al.* Reduced expression of TLR4 is associated with the metastatic status of human colorectal cancer. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, p. 21-29, 2007.

SIMIANTONAKI, N.; JAYSUBGHE, C.; KIRKPATRICK, C. J. Effect of pro inflammatory stimuli on tumor cell-mediated induction of endothelial cell adhesion molecules *in vitro*. **Exp Mol Pathol**, v. 73, p. 46-53, 2002.

SMIRNOVA, I.; HAMBLIN, M. T.; MCBRIDE, C. *et al.* Excess of Rare Amino Acid Polymorphisms in the Toll-like Receptor 4 in Humans. **GENETICS**, v. 158 (4), p. 1657-1664, 2001.

SONIS, S. T. Pathobiology of Oral Mucositis: Novel Insights and Opportunities. **J Support Oncol**, v. 5(9), p. 3-11, 2007.

STRINGER, A. M.; GIBSON, R. J.; LOGAN, R. M. *et al.* Faecal microflora and beta-glucuronidase expression are altered in an irinotecan-induced diarrhea model in rats. **Cancer Biol Ther**, v. 7(12), p.1919-25, 2008.

STRINGER, A.M.; GIBSON, R. J.; BOWEN, J.M. *et al.* Chemotherapy-induced modifications to gastrointestinal microflora: evidence and implications of change. **Curr Drug Metab**, v. 10(1), p.79-83, 2009.

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

SZCZEPANSKI, M.; CZYSTOWSKA, M.; SZAJNIK, M. *et al.* Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumour development and protects the tumour from immune attack. **Cancer Res**, v. 69, p. 3105–13, 2009.

TAKASHIBA, S.; NARUISHI, K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. **Periodontol**, v. 40, p. 94-106, 2006.

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

TRIFAN, O. C.; DURHAM, W. F.; SALAZAR, V. S. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Research**, v. 62, p. 5778-5784, 2002.

VAN DER GRAAF, C. A.; NETEA, M. G.; MORRE, S. A. *et al.* Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection. **Eur Cytokine Netw**, v.17, p. 29–34, 2006.

WANG, J. H.; MANNING, B. J.; WU, Q. D. *et al.* Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF- $\kappa$ B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a b-1 integrin-dependent mechanism. **J Immunol**, p. 170, v. 795– 804, 2003.

WANG, K.; KARIN, M. Tumor-elicited inflammation and colorectal cancer. **Adv Cancer Res**, v. 128, p. 173-96, 2015.

WANG, K.; YEC, Y.; XU, Z.; ZHANG, X.; HOUB, Z.; CUIF, Y.; SONG, Y. Interaction between BRCA1/BRCA2 and ATM/ATR associate with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 200, n. 1, p. 40-46, 2010.

WANG, T.; CAI, G.; QIU, Y. *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. **ISME J**, v. 6(2), p. 320-9, 2012.

WONG, D.V.T. Mediação do receptores TLR2, NOD1 e da proteína adaptadora Myd88 na modulação da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano. 2013, 197f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

WONG, D. V.; LIMA-JÚNIOR, R. C.; CARVALHO, C. B.; *et al.* The Adaptor Protein Myd88 Is a Key Signaling Molecule in the Pathogenesis of Irinotecan-Induced Intestinal Mucositis. **PLoS One**, DOI:10.1371/journal.pone.0139985, 2015.

WOO, P. C.; NG, W. F.; LEUNG, H. C. *et al.* Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacol Res**, v. 41(5), p. 527-32, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). American Cancer Society. **Global Cancer Facts & Figures**. 3<sup>o</sup> Ed. Atlanta, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso em: 15 jan 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Fact Sheet Cancer**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 15 jan 2018.

WU, Z.; HAN, X.; QIN, S. *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-fluorouracil in a mouse mucositis model. **Biomed Pharmacother**, v. 64(9), p. 589-93, 2010.

ZHU, L.; YUAN, H.; JIANG, T. *et al.* Association of *TLR2* and *TLR4* Polymorphisms with Risk of Cancer: A Meta-Analysis. **PLoS One**, DOI:10.1371/journal.pone.0082858, 2013.

**ANEXO 1**

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

**DECLARAÇÃO**

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

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

Fortaleza, 11 de outubro de 2011.

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

## ANEXO 2

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo das subpopulações linfocitárias sanguíneas na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

**Pesquisador:** Camila Fernandes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 65206216.7.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.028.024

**Apresentação do Projeto:**

estudo sera realizado no ambulatorio de oncologia do Hospital Universitario Walter Cantidio (HUWC), situado no bairro Rodolfo Teófilo. A populacao estudada sera de pacientes com diagnostico citologico ou histologico de Cancer Colorretal candidatos a quimioterapia de primeira linha com base em 5-fluoruracil e Irinotecano ou irinotecano isolado. Os individuos incluidos no projeto serao atendidos no ambulatorio, convidados, pelo pesquisador responsavel e/ou medico do setor envolvido com esta pesquisa, a participar do estudo e a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A estimativa inicial e de que o projeto conclua a analise de 80 pacientes e 160 voluntarios saudaveis, estes serao oriundos de bolsas de sangue do HEMOCE. Criterios de inclusao: Serao incluidos pacientes, atendidos no ambulatorio de oncologia do hospital locus do estudo, com diagnostico citologico ou histopatologico de Cancer Colorretal candidatos a quimioterapia baseada em irinotecan e 5-fluoruracil em 1a ou segunda linha, que apresentem as seguintes caracteristicas: Performance Status : ECOG entre 0 e 2; Expectativa de vida superior a 12 semanas; Interesse voluntario em participar da pesquisa confirmado pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Idade de 21-60 anos (adultos).Criterios de Exclusao: Diagnostico de outra Neoplasia em atividade ou metastases. Qualquer doenca inflamatoria, inclusive atopias. Radioterapia intestinal previa ou previsao de tratamento com irradicao durante

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275  
UF: CE Município: FORTALEZA  
Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 2.028.024

a quimioterapia. Gestação em andamento. Doenças autoimunes. Uso de corticoides ou imunossupressores. Patologias que cursam com imunossupressão. Os pacientes recém diagnosticados com câncer colorretal que aceitarem participar da pesquisa serão solicitados a assinar o TCLE. Serão coletados 10 mL de sangue venoso periférico antes do início da quimioterapia, no momento do diagnóstico. O mesmo paciente será acompanhado ao longo do tratamento com nova coleta de 10 ml de sangue venoso periférico nos dias 8, 15 e 22 do primeiro ciclo de quimioterapia. Os pacientes estudados receberão semanalmente um diário de sintomas os quais serão estimulados a preencher diariamente com a ajuda de seus familiares e cuidadores. Alterações do ritmo intestinal e sintomas associados a toxicidade gastrointestinal como tontura, dor abdominal, náuseas/vômitos, lesões orais e diarreia, bem como o consumo de loperamida e outros tratamentos instituídos serão considerados. Os pacientes serão pesados semanalmente e terão anamnese e exames físicos realizados para a pesquisa do estado nutricional e aferição rigorosa da toxicidade clínica. As reduções e atrasos de dose, relativos ao plano terapêutico inicial serão considerados na análise da toxicidade clínica. Os dados clínicos coletados serão compilados e organizados de forma a permitir a pesquisa de sua correlação com as alterações na frequência linfocitária, dosagem de citocinas e polimorfismo do receptor toll-like 4. Como controles, será utilizado sangue de doadores saudáveis oriundo do banco de sangue do hemocentro do Ceará. 10 mL de sangue heparinizado serão coletados por punção venosa periférica no Dia 1 (D1), D8, D15 e D22 do primeiro ciclo de quimioterapia, e diluído em 10 mL de PBS. Em seguida, a solução será submetida a separação em gradiente de ficoll para obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP). A contagem dos linfócitos será realizada em câmara de Neubauer. As células serão resuspensas em meio RPMI completo com 10% de soro fetal bovino (SFB) e marcadas com os anticorpos de superfície e intracelular. O plasma resultante da separação em gradiente de ficoll será utilizado para dosagem de citocinas por Luminex, de acordo com as recomendações do fabricante. Uma parte da amostra de sangue será utilizada para extração do DNA, seguida da análise de polimorfismo do receptor toll-like 4 utilizando a técnica de PCR em tempo real.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Avaliar a frequência de células linfocitárias Th1, Th2, Th17 e Tregs no sangue periférico de pacientes com câncer colorretal antes e durante a terapia com irinotecano.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275  
UF: CE Município: FORTALEZA  
Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 2.028.024

O presente projeto de pesquisa não trará risco aos seus participantes, exceto um pequeno desconforto ou dor no local da coleta de sangue.

**Benefícios:**

Os benefícios serão no âmbito da comunidade científica, com a descoberta de possíveis biomarcadores da mucosite intestinal causada pela quimioterapia nos pacientes, fato que no futuro pode auxiliar na melhoria da qualidade de vida.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

PESQUISA CONTRIBUIRÁ PARA O ENTENDIMENTO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO SURGIMENTO DE mucosite intestinal NOS PACIENTES COM Câncer Colorretal DURANTE O TRATAMENTO COM QUIMIOTERAPIA. ASSIM, PROPICIARÁ A descoberta de possíveis biomarcadores da mucosite intestinal causada pela quimioterapia nos pacientes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TERMOS ADEQUADOS.

**Recomendações:**

NADA A ACRESCENTAR.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

NADA A ACRESCENTAR.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_663537.pdf	08/04/2017 17:14:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	08/04/2017 17:14:23	Camila Fernandes	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	08/04/2017 17:13:28	Camila Fernandes	Aceito
Outros	cartadeencaminhamento.pdf	24/02/2017 14:44:34	Camila Fernandes	Aceito
Outros	anuenciadosetor.pdf	23/02/2017 15:35:31	Camila Fernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto.pdf	23/02/2017 15:34:33	Camila Fernandes	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275  
 UF: CE Município: FORTALEZA  
 Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.028.024

Investigador	projeto.pdf	23/02/2017 15:34:33	Camila Femandes	Aceito
Outros	anuenciaHU.pdf	15/02/2017 16:19:10	Camila Femandes	Aceito
Outros	temodecompromissousodedados.pdf	15/02/2017 16:17:45	Camila Femandes	Aceito
Outros	fieldepositario.pdf	15/02/2017 16:16:52	Camila Femandes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisadores.pdf	15/02/2017 16:15:55	Camila Femandes	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	15/02/2017 16:15:10	Camila Femandes	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	15/02/2017 16:12:18	Camila Femandes	Aceito
Outros	cartadeanuenciacontroleshemoce.pdf	19/12/2016 14:43:30	Camila Femandes	Aceito
Outros	lattes.pdf	28/09/2016 15:08:07	Camila Femandes	Aceito
Outros	Ficha.doc	28/09/2016 14:29:54	Camila Femandes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 24 de Abril de 2017

Assinado por:  
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA  
(Coordenador)

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000  
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275  
UF: CE Município: FORTALEZA  
Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br

**ANEXO 3**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO-TCLE****ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS SANGUÍNEAS NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO**

Você está sendo convidado como participante do projeto de pesquisa intitulado: "**Estudo das subpopulações linfocitárias sanguíneas na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano**". Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente todas as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos dessa pesquisa sejam esclarecidos

Este trabalho tem por objetivo investigar o papel das células do seu sistema de defesa do sangue no desenvolvimento de um efeito desconfortável que pode aparecer durante o tratamento do câncer colorretal, a mucosite intestinal. Além disso, será realizado um estudo genético para avaliar alterações em uma molécula presente nas células de defesa do sangue (polimorfismos do receptor Toll-like 4). Essas alterações serão correlacionadas com o grau de diarreia e a intensidade da mucosite. O tratamento é muito importante para combater as células do tumor que se originou no intestino. Os remédios indicados pelo médico são os mais eficazes, no combate à doença, disponíveis para o atual momento. Entretanto, estas medicações podem causar inflamação na boca e intestino, provocando aftas, úlceras (feridas), alteração do gosto dos alimentos, dor ao engolir e diarreia, além de diminuir o número de glóbulos brancos, células responsáveis pela defesa do seu organismo, muitas vezes prejudicando o andamento do tratamento e a sua eficácia. O estudo dessas células e desses polimorfismos é extremamente necessário, para identificação de marcadores biológicos que possam antecipar o risco de desenvolver determinadas reações. Os dados obtidos pelo estudo servirão para que futuros pacientes possam ter uma diminuição destes efeitos indesejáveis. Para tanto, você deverá realizar os exames de sangue nos dias indicados pela equipe médica que o atende. Será coletado 10mL de sangue de uma veia do seu braço, poderá causar um pequeno desconforto, mas não trará riscos à sua vida. Durante o período de quimioterapia, você terá visitas semanais ao seu médico, quando ele fará o acompanhamento clínico dos efeitos colaterais produzidos pela

quimioterapia. Você irá receber um diário de sintomas para preencher em casa, com a ajuda dos seus familiares com perguntas simples sobre os possíveis efeitos colaterais e medicações que vier a usar. Este diário será devolvido à equipe médica e substituído por outro em todas as semanas dos três primeiros ciclos de tratamento. É muito importante que você seja **cuidadoso** e **atento** no preenchimento do diário. Em hipótese alguma este material poderá sofrer qualquer outra análise sem o seu conhecimento e prévia autorização. Durante a pesquisa, você poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento. Sua identidade será mantida em sigilo, sendo a divulgação dos resultados dos exames totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão em ambiente acadêmico com propósito científico, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes por outros componentes da equipe de saúde, exceto pelos responsáveis diretos por seu tratamento. A sua participação deverá ser voluntária e consciente. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação neste estudo. Em qualquer momento, você terá o direito de desistir da pesquisa sem necessidade de dar explicações. A eventual desistência não acarretará prejuízo ou discriminação quanto à manutenção do seu tratamento

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra **Camila Fernandes** que pode ser encontrado no endereço a seguir: Rua Coronel Nunes de Melo, nº 1000, NPDM-LAFICA, Universidade Federal do Ceará, telefone celular: 85-997793854.

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira).

O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_anos, RG: \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do participante da pesquisa \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Assinatura\_\_\_\_\_

Nome do pesquisador \_\_\_\_\_Data\_\_\_\_\_

Assinatura\_\_\_\_\_

Nome da testemunha\_\_\_\_\_Data\_\_\_\_\_

Assinatura\_\_\_\_\_

(se o voluntário não souber ler)

Nome do profissional que aplicou o TCLE\_\_\_\_\_Data\_\_\_\_\_

Assinatura\_\_\_\_\_