



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

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA COM  
DEXAMETASONA REVERTE A DISMOTILIDADE GASTRINTESTINAL  
ASSOCIADA À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS.**

**JOSÉ NELSON BELARMINO FILHO**

**FORTALEZA-CE**

**2010**

**JOSÉ NELSON BELARMINO FILHO**

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA COM  
DEXAMETASONA REVERTE A DISMOTILIDADE GASTRINTESTINAL  
ASSOCIADA À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS.**

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

Orientador:

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

**FORTALEZA-CE**

**2010**

B371m Belarmino Filho, José Nelson

Modulação da resposta inflamatória com dexametasona reverte a dismotilidade gastrointestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos / José Nelson Belarmino Filho. – Fortaleza, 2010.

89 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce, 2010

1. Mucosite 2. Dexametasona 3. Metoclopramida I. Souza, Marcellus Henrique Loiola de (orient.) II. Título

CDD: 616.994341

**JOSÉ NELSON BELARMINO FILHO**

**MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA COM  
DEXAMETASONA REVERTE A DISMOTILIDADE GASTRINTESTINAL  
ASSOCIADA À MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR  
IRINOTECANO EM CAMUNDONGOS**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Antônio Aldo Melo Filho  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça  
Universidade Federal do Ceará

À Deus, por ter me dado força e perseverança para conseguir realizar esse sonho tão aspirado.

À minha esposa, Larissa, pela constante ajuda e compreensão durante esse período, pela sua paciência durante os momentos difíceis, pelos seus constantes incentivos e companheirismo. Às minhas filhinhas, Maria Eduarda e Maria Clara pela difícil compreensão quando não podia estar presente em suas brincadeiras.

Aos meus Pais, Nelson e Francisca e irmãos pelo constante ensinamento, incentivo e total apoio.

À minha sogra, Marília Prado, pela confiança e ajuda nos momentos difíceis durante essa etapa.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza, pelo seu total compromisso, pela sua incomparável orientação e pela sua participação em todas etapas desse trabalho, a quem devo todo o aprendizado e reconhecimento que um orientador possa ter. Agradeço ainda a paciência sempre dispensada nos inúmeros encontros para análise de resultados e delineamento de estratégia. Obrigado Prof. Marcellus !!!

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, por ser um eterno incentivador para que realizasse essa pós-graduação além de permitir o acesso ao seu laboratório e por ter sido sempre aquele amigo acessível nos momentos em que era procurado.

Ao amigo e aluno de Pós Doutorado do LAFICA, Dr. Roberto César, pessoa extremamente importante nesse trabalho, a quem sou totalmente grato pelos seus ensinamentos e ajuda sempre que solicitado. No decorrer desse trabalho aprendi a tê-lo como amigo e admirador de sua indiscutível capacidade.

Às alunas de iniciação científica Nara Granja, Karine Pacoal e Juliane Sampaio pela ajuda indispensável e constante presença durante os vários experimentos realizados no LAFICA. À vocês agradeço de coração a ajuda sempre prestada, pois essa foi essencial para a obtenção de nossos resultados e conclusão do mestrado. Obrigado !!!!

Aos amigos Flavio Bitencourt, Fabrine Martins, Saulo Coelho, Danusio Sartori, Aline Bernardino e Armando Falcão pela compreensão e constante ajuda durante essa caminhada. Obrigado amigos pela paciência e compreensão durante os momentos de ausência !

Ao Prof. Dr. Pedro Soares, meu co-orientador, a quem foi responsável por vários ensinamentos durante os experimentos e em momentos difíceis, a quem sou extremamente grato.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar e Prof. Dr. Alexandre Havt, pelos seus ensinamentos durante o exame de qualificação, a quem devo também uma parcela de aprendizado durante essa etapa.

À Profa. Dra. Gerly Anne, pela sua amizade e orientação durante os experimentos de análise histopatológica, a quem sou muito grato.

À todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pela ajuda direta ou mesmo indireta na contribuição desse trabalho.

À Coordenadora da Pós-Graduação, Profa. Dra. Helena Serra Azul, pelo seu constante carinho e atenção sempre que procurada.

Aos colegas de Pós-Graduação, Deysi Tenazoa, Ana Paula, Larisse Lucetti, Jand-Venes, André Luiz pela amizade e companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica Samuel Miranda, Lorena Rodrigues pela ajuda durante a execução dos experimentos.

Aos indispensáveis e excelentes técnicos Vandinha (LAFICA), José Ivan, Socorrinha (morfologia), Tiara Sena e Carol (LAFICA) pela amizade, colaboração para o sucesso desse trabalho.

À secretária Aura Rhanes e Marcia pela atenção e carinho sempre prestados.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

À todos que participaram direta ou indiretamente em alguma etapa para a execução desse trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
5-FU	5-Fluorouracil
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
APC	(7-etil-10-[5-acido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboxicamptotecina
CADS	Síndrome dispéptica associado à quimioterapia do câncer
CE	Enzima carboxiesterase
C-fos	Proto oncogene c-fos
C-jun	Proto oncogene c-jun
cm	Centímetro
cMOAT	Transportador canalicular multiespecífico de ânions orgânicos
D.O.	Densidade óptica
D1	dia 1
D7	dia 7
DEXA	Dexametasona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M.	Erro padrão da média
ELISA	Ensaio imunoenzimático
g	Grama
GLC	Glicocorticoide
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido sulfúrico
HE	Hematoxilina-eosina



HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
i.p.	Intraperitoneal
Iri	Irinotecano
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
Kg	Kilograma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
M	Molar
mg	Miligrama
min	minuto
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	milímetro cúbico
MPO	Enzima mieloperoxidase
MRP2	Proteína 2 associada à resistência multidroga
N	Normal
NaOH	Hidóxido de sódio
NF- $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear Kappa B
nm	nanômetro
NPC	(7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboxiamptotecina)
OPD	o-fenilenediamina diidrocloreto
PBS	Solução tamponada de fosfato

pg	Picograma
P-gp	Glicoproteína P
PTX	Pentoxifilina
rpm	Rotação por minuto
s	segundos
Sal	Salina
s.c.	subcutânea
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotecina (metabólito do irinotecano)
SN-38G	SN-38 glicuronídeo
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral – alfa
UDP-GT	Enzima urinina difosfato glicuronosil-transferase

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Estrutura química do cloridrato de irinotecano	20
<b>FIGURA 2</b>	Figura esquemática do metabolismo do irinotecano	23
<b>FIGURA 3</b>	Estrutura química da Dexametasona	31
<b>FIGURA 4</b>	Mecanismo de ação da dexametasona	34
<b>FIGURA 5</b>	Desenho esquemático do protocolo da mucosite intestinal experimental	40
<b>FIGURA 6</b>	Representação dos graus de diarreia após a administração de irinotecano por quatro dias consecutivos	42
<b>FIGURA 7</b>	Fotomicrografia do duodeno de camundongos <i>swiss</i> tratados com salina e dos animais submetidos à mucosite intestinal pela administração de irinotecano	52
<b>FIGURA 8</b>	Efeito do tratamento do irinotecano na morfometria duodenal de camundongos <i>Swiss</i>	53
<b>FIGURA 9</b>	Aumento da atividade de MPO no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> tratados com irinotecano ou salina	54
<b>FIGURA 10</b>	Efeito do tratamento com irinotecano nos níveis de citocinas (IL-1 $\beta$ , KC, TNF- $\alpha$ e IL-10) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i>	55
<b>FIGURA 11</b>	Análise do esvaziamento gástrico de animais tratados com salina e de animais que receberam irinotecano (IRI) avaliado nos tempo de 10, 20 e 30 minutos após a administração de vermelho de fenol	58
<b>FIGURA 12</b>	Avaliação do trânsito intestinal no curso da mucosite por irinotecano	59

<b>FIGURA 13</b>	Distribuição da refeição no trato digestório estimada de acordo com o método do centro geométrico	60
<b>FIGURA 14</b>	Efeito da dexametasona e da metoclopramida sobre a atividade da MPO intestinal em camundongo tratados com irinotecano	62
<b>FIGURA 15</b>	Fotomicrografia (100x) do duodeno de camundongos controle ou com mucosite intestinal por irinotecano e tratados ou não com dexametasona ou metoclopramida	63
<b>FIGURA 16</b>	Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida nas alterações morfométricas no duodeno de camundongos <i>Swiss</i>	65
<b>FIGURA 17</b>	Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida nos níveis de IL-1 no duodeno de camundongos <i>Swiss</i>	66
<b>FIGURA 18</b>	Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida no retarde do esvaziamento gástrico induzido por irinotecano	67
<b>FIGURA 19</b>	Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida sobre a aceleração do transito intestinal observado na mucosite por irinotecano	69
<b>FIGURA 20</b>	Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida sobre o centro geométrico da refeição na mucosite por irinotecano	70

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Irinotecano induz leucopenia, diarréia e mucosite intestinal	50
<b>TABELA 2</b>	Dexametasona reverteu diarréia, mas não a leucopenia, associados a mucosite por irinorecano em camundongos	61

## RESUMO

**Introdução:** A mucosite induzida por antineoplásicos é um fator limitante na terapia anticâncer. Mucosite é um termo clínico que descreve uma síndrome caracterizada por reação inflamatória da mucosa de todo o trato digestivo com ulcerações. A mucosite intestinal por antineoplásicos desencadeia alterações da motilidade digestiva. A dexametasona é um glicocorticoide cujo principal efeito farmacológico decorre de sua ação antiinflamatória e imunossupressora

**Objetivos:** Investigar a dismotilidade gastrointestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos, bem como avaliar o efeito da modulação farmacológica da resposta inflamatória sobre estas alterações motoras. **Métodos:** Camundongos Swiss machos (20–25g) foram tratados do D1-D4 com irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) ou com salina (0,1ml, i.p.), o sacrifício foi realizado no sétimo dia experimental. Afim de estudar alterações relacionadas à mucosite intestinal, amostras do duodeno, jejuno e íleo, foram removidas para avaliar a injúria epitelial por morfometria, escores histológicos, e atividade de MPO, tendo a diarreia sido avaliada antes do sacrifício. Para avaliação de citocinas amostras de duodeno foram retiradas e pelo método de ELISA foi determinada a concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10. Para avaliar a motilidade digestiva, os animais foram deixados em jejum de 18 horas do D6 para o D7. No D7, foram administrados 350 $\mu$ L da solução glicosada (5%) contendo vermelho de fenol (VF) a 0,75 mg/ml em cada animal antes do sacrifício. Após os tempos de 10, 20 e 30 min, os animais foram sacrificados e submetidos a uma laparotomia mediana, sendo o estômago retirado completamente e o intestino delgado dividido em 3 partes iguais: proximal, medial e distal. A seguir o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e trânsito gastrointestinal (centro geométrico) foram determinados por espectrofotometria. A seguir, em outro grupo experimental, foi avaliado se a modulação farmacológica do processo inflamatório poderia reverter às alterações da motilidade digestiva associadas à mucosite por irinotecano. Para tanto, dexametasona (2,5mg/kgm s.c.) ou metoclopramida (10mg/kg i.p.) do D1-D7, foram administradas 30 minutos antes da administração de irinotecano. A seguir foram avaliados todos os parâmetros descritos acima.

**Resultados:** O tratamento com irinotecano foi capaz de induzir uma lesão intestinal com um importante comprometimento da barreira epitelial funcional com a presença das seguintes alterações: diarreia, leucopenia, encurtamento acentuado das vilosidades intestinais, necrose parcial de criptas, aumento da atividade de MPO, aumento na concentração de KC e IL-1 $\beta$  e retarde do esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal e aceleração do trânsito intestinal. O tratamento com dexametasona, mas não metoclopramida, reduziu significativamente as lesões intestinais, com recuperação da altura dos vilos, da profundidade das criptas, diminuição da atividade de MPO, redução da concentração de IL-1 $\beta$ . Ademais, somente o tratamento com dexametasona, mas não por metoclopramida, foi capaz de reverter retarde do esvaziamento gástrico, bem como a aceleração do trânsito gastrintestinal. **Conclusão:** A mucosite intestinal induzida por irinotecano foi capaz de causar dismotilidade e resposta inflamatória gastrointestinal com participação de KC e IL1 $\beta$  a qual se associa com o retarde do esvaziamento gástrico e trânsito gastrintestinal e aceleração do trânsito intestinal. Concluímos ainda que a dexametasona, mas não metoclopramida, reduziu a resposta inflamatória e modulou parcialmente a dismotilidade gastrointestinal associada à mucosite por irinotecano.

**Palavras-chave:** mucosite intestinal, irinotecano, dexametasona, metoclopramida.

## ABSTRACT

**Introduction:** Mucositis induced by antineoplastic drugs is a limiting factor in anticancer therapy. Mucositis is a clinical term which describes a syndrome characterized by mucosal ulceration of the entire digestive tract. Mucositis results from intestinal inflammatory events, which induces changes in gastrointestinal motility. Dexamethasone is a glucocorticoid whose main pharmacological effect is anti-inflammatory and immunosuppressive. **Objectives:** To investigate the gastrointestinal dysmotility associated with irinotecan-induced intestinal mucositis in mice and to assess the effect of pharmacological modulation of the inflammatory response on these motor abnormalities. **Methods:** Swiss male mice (20-25g) were treated in the D1-D4 with irinotecan (75 mg / kg, ip) or saline (0.1 ml, ip), the sacrifice was performed on the seventh day trial in order to study changes related to intestinal mucositis. Samples of duodenum, jejunum and ileum were removed to assess the epithelial injury by morphometry, histological scores and MPO activity, and diarrhea were evaluated before sacrifice. For evaluation of cytokine samples of duodenum were removed and the ELISA was determined concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , KC and IL-10. In order to evaluate gastrointestinal motility, the animals were kept fasting for 18 hours from D6 to D7. In D7, were administered 350 $\mu$ L of glucose solution (5%) containing phenol red (VF) to 0.75 mg / ml in each animal prior to sacrifice. After the times of 10, 20 and 30min, animals were sacrifice. Stomach was totally removed, and small intestine was divided into 3 parts: proximal, medial and distal. The gastric emptying, intestinal transit and gastrointestinal transit were determinate by spectrofotometry. In other experimental group, we evaluated if pharmacological modulation of the inflammatory process could reverse the gastrointestinal dysmotility associated with irinotecan- induced intestinal mucositis. Then, dexamethasone (2.5 mg / kg sc) or metoclopramide (10mg/kg ip) of D1-D7 were administrated 30 minutes before irinotecan administration and all of parameters described before were evaluated **Results:** Treatment with irinotecan was able to induce an intestinal lesion with significant impairment of epithelial barrier function in the presence of the following changes: diarrhea, leukopenia, marked shortening of the villus, crypts of partial necrosis, increase in MPO activity, increased concentrations of IL-1  $\beta$  and changes in gastrointestinal motility. Treatment with dexamethasone, but not with metoclopramide, significantly reduced the intestinal lesions, with recovery of villous height, crypt depth, decreased MPO activity, reduced concentrations of IL-1 $\beta$ . In addition, dexamethasone, but not metoclopramide, was able to reverse the delay in gastric emptying and increase in intestinal transit. **Conclusion:** The intestinal mucositis induced by irinotecan was able to cause gastrointestinal dysmotility and inflammatory response with the participation of KC and IL1 $\beta$  which is associated with delay gastric emptying and gastrointestinal transit and acceleration of intestinal transit. It is also concluded that dexamethasone, but not metoclopramide, reduced the inflammatory response and modulated in part the gastrointestinal dysmotility associated with irinotecan-induced intestinal mucositis.

**Keywords:** intestinal mucositis, irinotecan, dexamethasone, metoclopramide.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Cloridrato de irinotecano</b> .....	19
1.1.1 Estrutura química.....	20
1.1.2 Farmacocinética .....	20
1.1.3 Metabolismo do irinotecano .....	22
1.1.4 Mecanismo de ação.....	23
1.1.5 Toxicidade.....	23
1.2 Resposta inflamatória na mucosite por anti-neoplásico.....	24
1.3 Alterações da motilidade associada a mucosite por antineoplásico.....	28
1.4 Dexametasona.....	29
1.5 Metoclopramida.....	33
<b>1.6 OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1 Animais de experimentação .....	37
3.2 Drogas, soluções, corantes e anticorpos .....	37
3.3 Mucosite gastrintestinal por irinotecano .....	39
3.4 Grupos experimentais .....	40
3.5 Parâmetros avaliados .....	40
3.5.1 Avaliação do parâmetro hematológico .....	40
3.5.2 Avaliação do grau de diarreia .....	40
3.5.3 Análise histopatológica e morfometria da mucosite intestinal.....	41



3.5.4	Atividade da mieloperoxidase .....	42
3.5.5	Dosagem de citocinas .....	44
3.5.6	Esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e trânsito gastrintestinal.....	45
3.5.7	Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida nas alterações inflamatórias e funcionais associada à mucosite intestinal por irinotecano.....	46
3.5.8	Análise estatística .....	47
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
4.1.	Efeito do tratamento com irinotecano sobre os leucócitos totais, diarreia e mucosite intestinal em camundongos <i>swiss</i> .....	49
4.2.	Alterações histopatológicas no duodeno induzidas pelo tratamento com irinotecano em camundongos <i>swiss</i> .....	49
4.3.	Alterações morfométricas no duodeno induzidas pelo tratamento com irinotecano em camundongos <i>swiss</i> .....	50
4.4.	Aumento da atividade de MPO no duodeno de camundongos <i>swiss</i> tratados com irinotecano.....	50
4.5.	A mucosite intestinal por irinotecano eleva os níveis de IL-1, kC no duodeno de camundongos <i>swiss</i> .....	53
4.6.	Esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos <i>swiss</i> acordados e tratados com irinotecano.....	54
4.7.	Trânsito intestinal da refeição no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos. ....	55
4.8.	Determinação do centro geométrico da refeição no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.....	55
4.9.	Efeito do tratamento com dexametasona e metoclopramida sobre a leucopenia e diarreia associados à mucosite por irinorecano.....	58

4.10. Efeito da dexametasona e da metoclopramida sobre a atividade da MPO intestinal em camundongo tratados com irinotecano .....	59
4.11 Alterações histopatológicas em intestino proximal de camundongos <i>swiss</i> que receberam irinotecano e tratados com dexametasona ou metoclopramida.....	60
4.12 Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida nas alterações morfométricas observadas na mucosite intestinal por irinotecano em camundongos.....	62
4.13. O tratamento com dexametasona, mas não metoclopramida, diminui significativamente o aumento do nível de IL-1 no duodeno de camundongos portadores de mucosite intestinal por irinotecano.....	64
4.14 Dexametasona, mas não metoclopramida, reverteu o retardo do esvaziamento gástrico associado à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	65
4.15 Dexametasona, mas não metoclopramida, preveniu a aceleração do trânsito intestinal associado à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	66
4.16. Determinação do centro geométrico da refeição no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos tratados ou não com dexametasona ou metoclopramida.....	66
<b>5.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>88</b>

# ***1. Introdução***

## 1.1 - CLORIDRATO DE IRINOTECANO (IRINOTECANO)

O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina. Esta substância foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por Wall *et al.*, em 1966, de uma planta nativa na China e no Tibet, *Camptotheca acuminata*. O irinotecano e seu metabólito ativo (SN-38) são inibidores seletivos da topoisomerase I, uma enzima envolvida na replicação e transcrição do ácido desoxirribonucléico (DNA). Nos últimos anos, o IRINOTECANO tem sido utilizado como agente único ou combinado com outros protocolos no tratamento de primeira e segunda linha do câncer colorretal (SALTZ *et al.*, 2001), e também utilizado no câncer de ovário (FUJII *et al.*, 2002), linfoma de Hodgking (RIBRAG *et al.*, 2003), câncer de pulmão de células pequenas e não-pequenas células (LANGER, 2004), pâncreas (ROCHA-LIMA *et al.*, 2004), mama (PEREZ *et al.*, 2004) e de estômago (ENZINGER *et al.*, 2005).

A ação desses antineoplásicos não se limita somente às células neoplásicas, com isso essas drogas podem atuar em células normais, tendo como resultado importantes efeitos colaterais, que em certas situações podem determinar desde a redução do esquema terapêutico, até a sua total interrupção, podendo levar um grande prejuízo na eficácia do tratamento oncológico. Dentre esses feitos nosso trabalho se propõe a estudar a mucosite intestinal induzida por irinotecano.

### 1.1.1 - ESTRUTURA QUÍMICA

O irinotecano é um sal triidratado, 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carboniloxi-camptotecina, que possui um anel ( $\alpha$ -hidroxi-3-lactona) que sofre hidrólise reversível no lúmen intestinal produzindo carboxilato e lactona (GUPTA *et al.*, 1997; DODDS *et al.*, 1998; IKEGAMI *et al.*, 2006a). A estrutura do irinotecano na forma de lactona pode ser vista na figura 1.

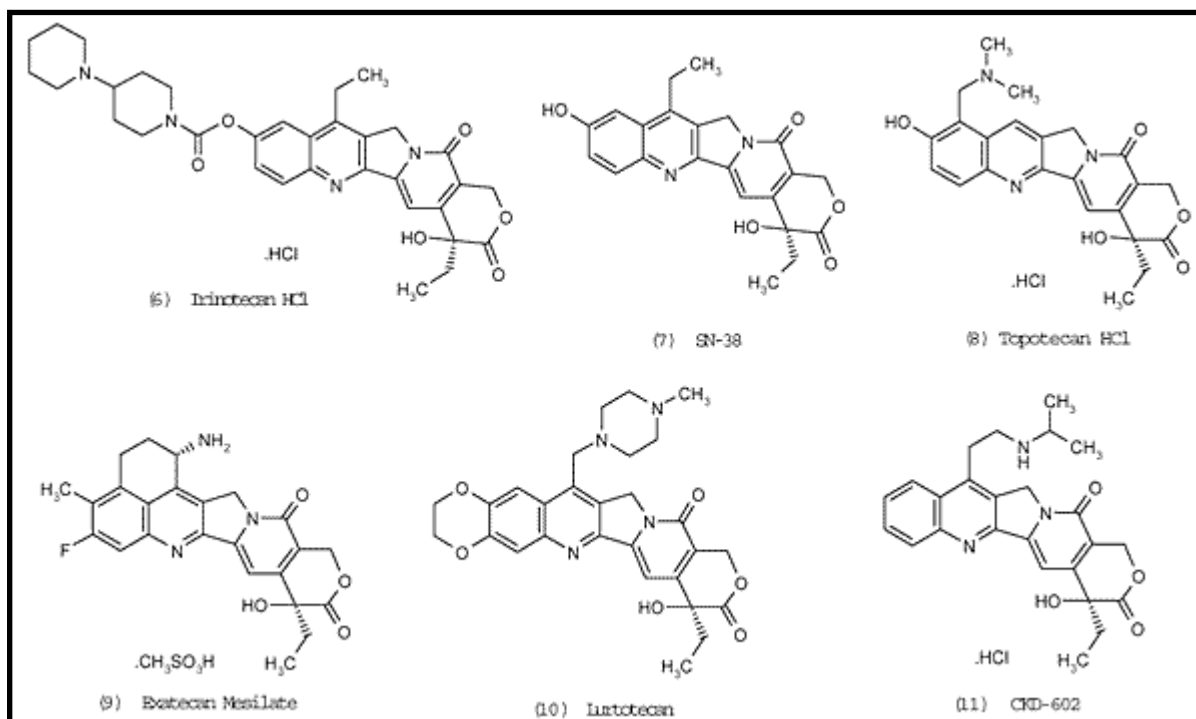


FIGURA 1 – Estrutura química do cloridrato de irinotecano. Fonte: DODDS *et al.*, 1998

### 1.1.2 - FARMACOCINÉTICA

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

particularmente hCE2. O SN-38 é de 100 a 1000 vezes mais ativo que o irinotecano (RIVORY *et. al.*, 1996; XIE *et. al.*, 2002, CHESTER *et. al.*, 2003). A CE encontra-se presente abundantemente no fígado e em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. Esta enzima libera a cadeia lateral da dipiperidina presente na posição C-10 da molécula de irinotecano (ALIMONTI *et. al.*, 2004).

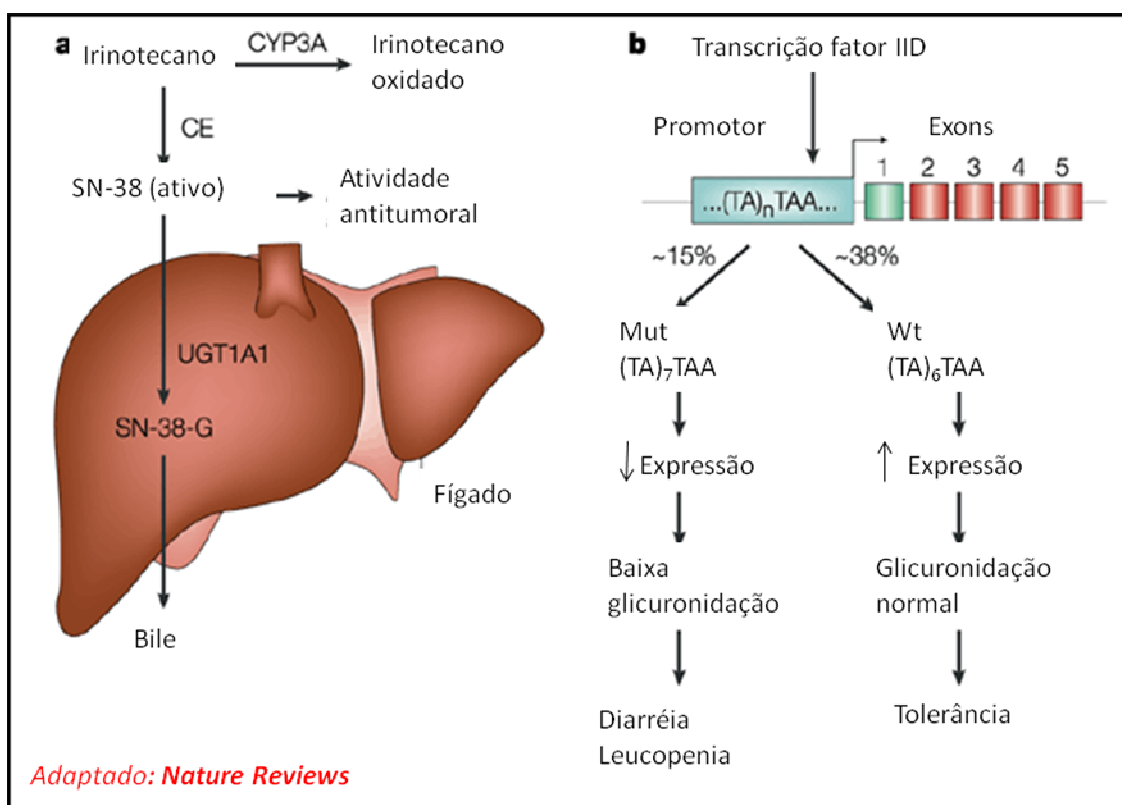
Após a administração intravenosa, em seres humanos, o irinotecano, sob a forma de lactona, tem meia-vida de aproximadamente 6 a 8 horas (5 a 9 horas), enquanto que a meia-vida do SN-38 é de aproximadamente 11,05 horas (9,1 a 13 horas). A depuração sistêmica é de aproximadamente 46,9 L/h/m<sup>2</sup> (TAKAMITO; ARBUCK, 2001) sendo o volume de distribuição para as doses de 125mg/ m<sup>2</sup> e 340 mg/ m<sup>2</sup> de 110 ± 48,5 L/ m<sup>2</sup> e 234 ± 69,6 L/ m<sup>2</sup>, respectivamente (ALIMONT *et. al.*, 2004).

O metabolismo do irinotecano da droga é principalmente hepático por uma enzima do sistema CYP450, particularmente CYP3A4, que gera componentes inativos como APC (7-etil-10-[5-acido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino1-piperidino]- carboxicamptotecina) (CHESTER *et. al.*, 2003; MATHIJESSEN *et. al.*, 2004). Pequena parte do APC pode ser metabolizada pela CE em SN-38 (RIVORY *et. al.*, 1996, MATHIJESSEN *et. al.*, 2004). Já o NPC é metabolizado completamente em SN-38 por esta enzima, contribuindo na atividade e toxicidade do irinotecano *in vivo* (RIVORY *et. al.*, 1996; DODDS *et. al.*, 1998; MATHIJESSEN *et. al.*, 2004).

Após irinotecano ser convertido em SN-38 nos tecidos, a detoxificação ocorre pela conjugação com a enzima urinina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-GT) – UGT1A1, com a formação de SN-38 glicuronídeo (SN-38G), composto inativo (HAAZ *et. al.*, 1997, CHESTER *et. al.*, 2003; MATHIJESSEN *et. al.*, 2004).

Irinotecano e SN-38 são transportados ligados as seguintes proteínas; glicoproteína P (P-gp), transportador canalicular multiespecífico de ânions orgânicos (cMOAT) e proteína 2 associada à resistência multidroga (MRP2) (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; TAKASUNA *et. al.*, 2006).

### 1.1.3 - MATABOLISMO DO IRINOTECANO



**FIGURA 2 – Figura esquemática do metabolismo do irinotecano.** No fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o irinotecano gerando dois compostos inativos, APC (7-etil-10-(4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperideno)-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-(4-amino-1-piperideno)-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela 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 e SN-38 (SN-38G), que são desprovidos de atividade biológica. Irinotecano, SN-38 e SN-38G são excretados na bile através das proteínas de transporte MDR1 (*Multidrug resistance protein 1*) e MRP2 (*Multidrug resistance associated protein 2*) e chegam ao intestino delgado. No intestino delgado o irinotecano pode ser clivado pela CE intestinal, formando mais SN-38. Além disso, o SN-38G pode ser conjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de  $\beta$ -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido dando início a um processo de recirculação entero-hepática (TERINEN-MOSLEN *et.al.*, 2006, HAAX, *et.al.*, 1998; CHESTER *et.al.*, 2003; MATHIJSEN *et.al.*, 2004; DODDS *et.al.*, 1998; KHERER *et.al.*, 2000; PIZZOLATO *et.al.*, 2003; GUPTA *et.al.*, 1994; CHU *et.al.*, 1997; IYER *et.al.*, 2001) Extraído de Freitas HC, 2007. (adaptado do Nature Reviews)

#### **1.1.4 - MECANISMO DE AÇÃO**

O irinotecano e seu metabólito ativo (SN-38) são inibidores seletivos da topoisomerase I, uma enzima envolvida na replicação e transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA). As topoisomerasas mantêm a conformação tridimensional do DNA através da remoção dos espirais durante a replicação e transcrição, aliviando a tensão da torção produzida pelo enrolamento da molécula. A citotoxicidade deve-se ao dano no DNA durante a fase S do ciclo celular, quando as enzimas de replicação do DNA colidem com um complexo ternário da droga, com o DNA e com a topoisomerase I. Este dano induzido pela droga não é corrigido de forma eficaz, provocando apoptose (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; ALIMONT *et.al.*, 2004).

O irinotecano e o SN-38 na forma de carboxilato são inibidores menos potente da topoisomerase I e têm atividade antitumoral mais fraca que a lactona. Entre as duas formas há um equilíbrio pH-dependente, sendo que o pH ácido promove formação de lactona e o pH básico resulta na forma aniônica do hidroxíácido (ARIMORI *et. al.*, 2001; IKEGAMI *et. al.*, 2002).

#### **1.1.5 - Toxicidade**

Dos efeitos colaterais relacionados ao uso do irinotecano podemos citar como principais os seguintes: neutropenia, mucosite e diarreia que frequentemente ocorre de forma simultânea.

As camptotecinas têm em geral menos efeitos adversos que a maioria dos agentes antineoplásicos (RANG *et. al.*, 2001) Os efeitos tóxicos mais graves e que limitam o seu uso são a mielossupressão (principalmente neutropenia) e a diarreia



tardia (SALIBA *et. al.*, 1998; TAKIMOTO, ARBUCK, 2001; CHESTER *et. al.*, 2003; ALIMONTI *et. al.*, 2004). Outros efeitos adversos grau (3 e 4) relatados são: náuseas e vômitos (9%), astenia (14%), alopecia (53%), elevação das transaminases hepáticas (8%) e anemia (9%) (ABIGERGES *et. Al.*, 1995).

A neutropenia, apesar de alta incidência, 23% (ENZINGER *et.al.*, 2005) a 43% dos pacientes (ROSATI *et. al.*, 2002), pode ser facilmente tratada com a administração de G-CSF (fator estimulante da colônia de granulócitos) (ALIMONTI *et. al.*, 2004).

Quanto à diarreia induzida pelo uso de irinotecano pode ser dividida em duas fase: uma diarreia aguda ou precoce e uma diarreia crônica ou tardia (RUBEINSTEIN *et. al.*, 2004). A primeira, de curso geralmente leve, ocorre durante ou logo após a administração da droga pelo aumento da atividade colinérgica, pois o irinotecano inibe acetilcolinesterase (AChE) (GANDIA *et. al.*, 1993; DODDS *et. al.*, 1999; DODDS; RIVORY, 1999; DODDS *et. al.*, 2001). A segunda, de início tardio, possui alta incidência, em torno de 82% (SALIBA *et. al.*, 1998), e, quando grave, pode limitar a eficácia do tratamento, já que muitas vezes é necessário reduzir sua dose ou até mesmo suspender o próprio tratamento (ABIGERGES *et. al.*, 1994; IKEGAMI *et. al.*, 2002; DUNCAN; GANT, 2003; ALIMONTI *et. al.*, 2004).

## **1.2 - RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA MUCOSITE POR ANTI-NEOPLÁSICO**

Mucosite alimentar ou gastrointestinal é o termo clínico usado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral ou mucosa intestinal). Esta síndrome, a depender da gravidade, caracteriza-se por ulceração da mucosa do trato digestivo, podendo resultar em dor,

disfagia, diarreia e disfunção, de acordo com o tecido afetado (Sonis & Fay, 2002; Sonis *et al.*, 2004; Scully & Sonis, 2006).

De forma geral, cerca de 15 a 40% dos pacientes em quimioterapia apresentam algum grau de mucosite (Scully *et al.*, 2003; 2004). A combinação de diferentes drogas antineoplásicas aumenta essa incidência de 40-70% (Roth *et al.*, 1991; Scully & Sonis, 2006). Esta incidência pode chegar próxima a 100% naqueles pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (Rubenstein *et al.*, 2004).

A ocorrência de mucosite e seu grau de intensidade podem retardar ou impedir a continuação do tratamento antineoplásico. Pacientes que apresentaram mucosite tendem a receber doses reduzidas de quimioterapia nos ciclos subseqüentes ao episódio de mucosite (Rubenstein *et al.*, 2004). Além disso, em pacientes neutropênicos, a presença de mucosite representa um aumento de quatro vezes no risco de sepse (Pico *et al.*, 1998). Portanto, esse efeito adverso tem o potencial de interferir diretamente na eficácia do tratamento.

Cerca de 5-15% dos pacientes podem ser acometidos de mucosite mais grave (graus 3 e 4). Destes, 35% sofrerão um atraso nos ciclos subseqüentes de quimioterapia, 60% irão requerer redução nas doses aplicadas e 30%, a descontinuação do regime de tratamento. Em geral, 60% apresentam febre e requerem hospitalização (Keefe *et al.*, 2007).

Sonis e colaboradores descreveram a mucosite por antineoplásicos como um processo complexo, no qual ocorre a seguinte seqüência de eventos biológicos interligados: iniciação, resposta primária ao dano, sinalização (e amplificação), ulceração e, finalmente, cicatrização (Sonis *et al.*, 2004; Scully & Sonis, 2006). A manifestação de todos os estágios não ocorre obrigatoriamente em todos os casos. Portanto, uma mucosite branda, com poucos danos à mucosa, rápida recuperação e

proliferação epitelial, evita a ocorrência da fase ulcerativa, a mais sintomática (Sonis & Fay, 2002).

A fase de iniciação ocorre logo após a radiação ou quimioterapia. A lesão celular direta das células epiteliais ocorre simultaneamente com a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio (SONIS *et. al.*, 2004). A resposta primária ao dano, observada nas células e tecido da submucosa, é caracterizada pela expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg I, e pela ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) (SCULLY *et.al.*, 2006). Em paralelo a ativação de NF- $\kappa\beta$ , enzimas como esfingomielina e a seramida sintetase, que catalizam a síntese de seramida, são ativadas diretamente pela radio ou quimioterapia, ou indiretamente pelas espécies reativas de oxigênio e TNF- $\alpha$ . A via de seramida induz apoptose tanto em células submucosa, como epiteliais (MADDENS *et.al.*, 2002). Adicionalmente a destruição de fibronectina também ocorre nessa fase da mucosite, resultando na ativação de macrófagos e posterior injúria tecidual, mediada pelas metaproteinase e produção adicional de TNF- $\alpha$ . A participação de TNF- $\alpha$  na patogênese da mucosite oral foi evidenciada através de trabalho de nosso grupo que mostrou que a pentoxifilina e a talidomida, ambas inibidores da sintase de TNF- $\alpha$ , reduzem significativamente a lesão oral induzida por 5-Fluorouracil (5-FU) em hamster (LIMA *et.al.*, 2005).

A próxima fase, ulcerativa, é a mais sintomática e ocorre durante o período de neutropenia grave do paciente. A lesão e morte das células basais epiteliais resultam e mudanças atróficas que culminam na real deterioração e quebra da barreira mucosa. Nessa fase é comum a ocorrência de infecções secundárias, visto que a lesão pode servir de foco para colonização de microrganismos. Os produtos da parede celular de bactérias penetram na submucosa e estimulam a liberação de

citocinas pró-inflamatórias, resultando em inflamação, dor, possíveis infecções secundárias ou mesmo influxo sistêmico de microrganismo e toxinas que, associado à neutropenia induzida pelas drogas antineoplásicas, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (ELTING *et.al.*, 1992, SONIS *et. l.*, 2004).

A fase cicatricial é biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, estimulando a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. Além de observar re-colonização da microbiota normal e além da recuperação do número de leucócitos (SONIS *et.al.*, 2004). Em nosso laboratório, nosso grupo demonstrou que a glutamina e seu derivado estável alanil-glutamina aceleram a recuperação da mucosa oral lesada pelo uso de 5-FU (LEITÃO *et.al.*, 2007).

Em relação à mucosite por irinotecano, os dados de nosso laboratório em camundongos mostrou que o irinotecano causou uma significativa diarreia nos animais, com diminuição dos vilos intestinais e perda da arquitetura das criptas.(Lima, 2008). Ademais, Melo e colaboradores (2007), demonstraram que a mucosite por irinotecano aumentou significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  no quinto e sétimo dia. Entretanto citocinas, como IL-1 $\beta$  e KC (homólogo da IL-8 no homem) apresentou níveis elevados apenas no sétimo dia e quanto ao uso da pentoxifilina (PTX) em seu trabalho observaram que esta preveniu de forma significativa as alterações morfofuncionais (achatamento das vilosidades e diarreia) e histopatológicas (necrose das criptas e infiltrado inflamatório) Melo e colaboradores (2007), uma vez que tais efeitos parecem ser conseqüência de sua capacidade em inibir de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e iNOS.

### **1.3 - ALTERAÇÕES DA MOTILIDADE ASSOCIADA A MUCOSITE POR ANTINEOPLÁSICO**

No decorrer dos últimos anos, muitos autores tentaram buscar uma explicação para as alterações de motilidade observadas durante e após os processos inflamatórios da mucosa intestinal. Esses distúrbios são advindos de mudanças tanto na estrutura, como na função do intestino, além de serem também observados na fase pós inflamação (COLLINS, 1996; GROSSI et al., 1993; HOSSEINI et al., 1999).

Está descrito na literatura que a terapia antineoplásica apresenta como efeitos colaterais mais freqüentes os sintomas gastrintestinais, como náusea e vômito. Contudo, depois da introdução dos antagonistas dos receptores de serotonina o cuidado desses problemas tiveram uma boa resolução. (HICKOK et al., 2003). Entretanto, pacientes sob terapia antineoplásica podem sofrer de outros sintomas, como dispepsia, disfagia e diarréia que não são controlados por drogas antieméticas (RIEZZO et al., 2005). O conjunto desses sintomas foi denominado de síndrome dispéptica associado ao câncer. Recentemente pesquisadores sugerem que parte da causa dessa síndrome pode está associada a anormalidades da motilidade do trato gastrointestinal (RIEZZO et al., 2002).

Os dados da literatura mostram em parte que as alterações da motilidade gastrintestinal que são provenientes dos efeitos colaterais da quimioterapia do câncer podem ser associados ou mesmo causadas por eventos inflamatórios. E os mesmos achados na literatura reforçam a hipótese que as alterações funcionais advindas de processos inflamatórios e pós inflamatórios podem ter contribuição de alterações estruturais do músculo liso gastrintestinal e/ou alterações neuronais principalmente do plexo mioentérico. Essas observações sugerem claramente que a

inflamação do trato gastrointestinal pode causar significativas alterações funcionais (SOARES, 2008).

Dados de nosso laboratório demonstram pela primeira vez que os efeitos da mucosite intestinal induzida por 5-FU em rato, esta associada à desordens da motilidade gastrointestinal (retarde no esvaziamento gástrico e hipercontratilidade do músculo liso gastrointestinal) tanto na fase inflamatória como na fase pós-inflamatória da mucosite intestinal por 5-FU em ratos. (Soares et.al., 2008).

Faltam estudos na tentativa de avaliar se a modulação da resposta inflamatório na mucosite intestinal pode estar acompanhada de melhoras das alterações motoras.

#### **1.4 - DEXAMETASONA**

A dexametasona (DEXA) é um glicocorticóide, análogo sintético da hidrocortisona (figura 3), cujo principal efeito farmacológico decorre de sua ação antiinflamatória e imunossupressora. Uma vez absorvidos, os glicocorticóides se ligam à globulina ligadora de corticosteróide (GLC) e penetram nas células por difusão simples. A metabolização ocorre no fígado (DALE, 2008).



A indução da síntese de lipocortinas, proteínas pertencentes à superfamília de proteínas dependentes de cálcio, as anexinas, tem sido sugerido como um dos principais mecanismos pelo qual os glicocorticóides, como a dexametasona, desempenham a sua atividade antiinflamatória (FLOWER, 2006; PEERS et al., 1993). Essas proteínas possuem atividade anti-fosfolipase A<sub>2</sub>, reduzindo assim, a biossíntese de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e PAF (FLOWER, 2006).

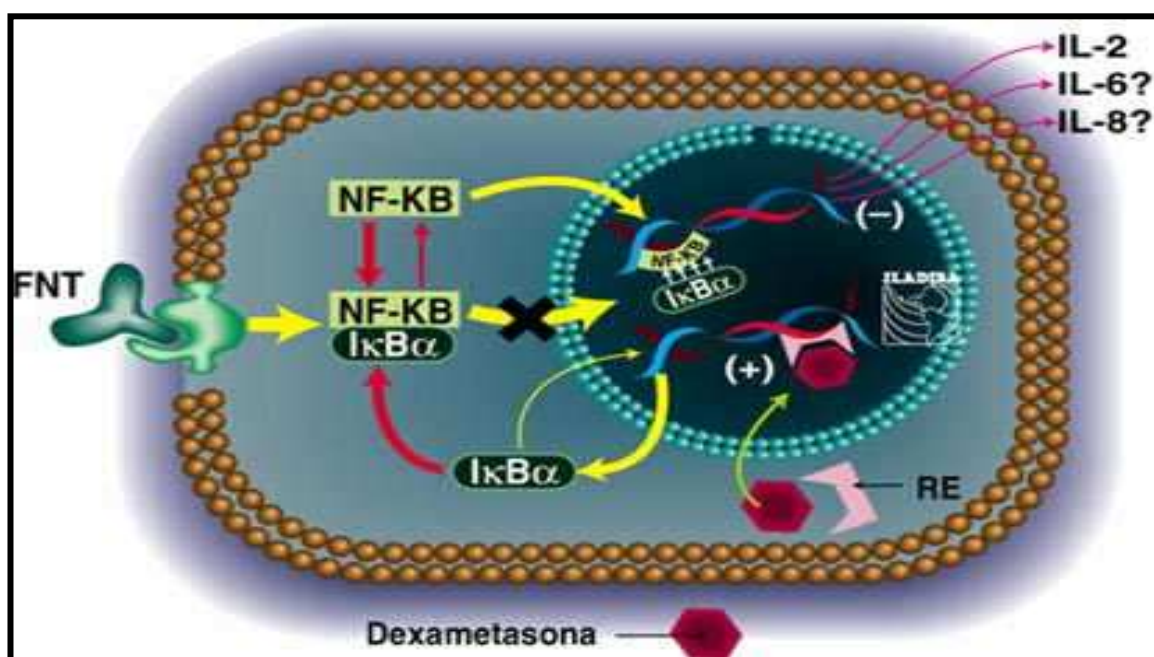
Os glicocorticóides também exercem importantes ações sobre as respostas imunológicas específicas do hospedeiro, pelo menos parcialmente, através de seus profundos efeitos sobre a produção de citocinas (SCHIMMER & PARKER, 1996). A dexametasona possui efeito inibitório sobre a síntese de citocinas, tais como a IL-1 $\beta$ , IL-8, e TNF- $\alpha$ , devendo ser destacado que, além de inibir sua produção, também bloqueia vários dos seus efeitos, como é o caso da redução da expressão de receptores para IL-8 (BARNES & ADCOCK, 1993).

Considerando os glicocorticóides como importantes agentes antiinflamatórios, cujos efeitos são parcialmente devidos à atenuação da produção de citocinas pró-inflamatórias (BLEEKER *et al.*, 1997), é importante ressaltar que as ações imunossupressoras e antiinflamatórias dos glicocorticóides estão indissoluvelmente ligadas, talvez porque ambas resulta, em grande parte, da inibição de funções específicas dos leucócitos (BOUMPAS, 1993).

Por estas razões, os glicocorticóides têm representado importante e muitas vezes decisivo instrumento terapêutico no manejo de várias patologias. Sabe-se, no entanto, que o seu uso prolongado é limitado por importantes efeitos adversos.



O NF- $\kappa$ B atua como fator de transcrição, tendo um papel importante na inflamação e nas reações de fase aguda. O NF- $\kappa$ B também protege as células da apoptose por manter a transcrição do c-Myc, o qual é necessário para a sobrevivência das células e permite a ativação de genes anti-apoptóticos. O I $\kappa$ B liga-se ao NF- $\kappa$ B, inibindo a sua transferência para o núcleo e a sua função como fator de transcrição. Os glicocorticóides atuam por aumento na síntese de I $\kappa$ B, diminuindo a ativação do NF- $\kappa$ B e a expressão do c-Myc. Este mecanismo de alteração do sinal de ativação, executado pelos glicocorticóides, contribui para o efeito apoptótico das células linfóides (FIGURA 4) (KLASSEN *et al.*, 2001).



Na mucosite por 5-FU a dexametasona inibiu a resposta inflamatória, entretanto, faltam estudos na mucosite por irinotecano.

## **1.5 - METOCLOPRAMIDA**

A metoclopramida é considerada um dos estimulantes mais seletivos da motilidade (agente procinético). Além de suas propriedades colinomiméticas, a metoclopramida é um potente antagonista da dopamina. Esse fármaco aparentemente aumenta a liberação de acetilcolina nos neurônios colinérgicos no plexo mioentérico do sistema nervoso entérico e não aumentam a secreção gástrica ou pancreática (KATZUNG, 1995).

## ***2. Objetivo***

## **OBJETIVOS**

### **2.1 - OBJETIVO GERAL**

- Investigar a dismotilidade gastrintestinal associada à mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos, bem como avaliar o efeito da modulação farmacológica da resposta inflamatória sobre estas alterações motoras.

### **2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar a resposta inflamatória intestinal (histologia, dosagem de MPO e de IL-1, TNF, KC e IL-10), bem como a presença de leucopenia e diarreia no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos;
- Investigar as alterações no esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e trânsito gastrintestinal em animais com mucosite por irinotecano;
- Analisar o efeito do tratamento com dexametasona ou com metoclopramida nos achados inflamatórios (histologia, dosagem de MPO e IL-1) e funcionais (esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e trânsito gastrintestinal) presentes na mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.

## ***3. Material e Métodos***

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (n=6), com peso variando entre 20 e 25 g, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram acomodados em caixas apropriadas, em ambiente com temperatura controlada que variava entre 20 a 24°C. A dieta oferecida foi ração Purina® balanceada utilizada rotineiramente no biotério, e água à vontade. Os experimentos realizados seguiram o Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório, padronizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que segue as normas da *National Research Council* (U.S.A., 1996). O projeto foi previamente submetido e posteriormente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, conforme protocolo 063/2009 – ANEXO 1.

#### **3.2 - Drogas, soluções, corantes e anticorpo**

- Cloridrato de irinotecano (evoterin® - 20mg/mL) ampola de 5mL, laboratório Evolabis;
- Dexametasona (decadron® 4mg/mL), frasco ampola 2,5mL, laboratório Aché;
- Metoclopramida (noprosil®-5mg/mL), frasco amola, laboratório isofarma;
- Solução salina: NaCl 0,9% (fraco de 500mL), laboratório Gaspar Viana;
- Álcool etílico 70%, laboratório Merck;
- Tampão fosfato de potássio: solução A (988mL) + solução B (12mL);

### Solução A

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ----- 6,8g

Água destilada ----- 1L

### Solução B

Água destilada ----- 1L

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) ---- 5g

Tampão fosfato de potássio ----- 1L

- Peróxido de hidrogênio (0,1%)

Peróxido de hidrogênio 30% (vetec) ----- 1mL

Água destilada ----- 29mL

- Solução de o-dianisidina

o-dianisidina (sigma) ----- 16,7mL

Tampão fosfato de potássio ----- 10mL

$\text{H}_2\text{O}_2$  ----- 50 $\mu\text{L}$

Água destilada ----- 90mL

- Solução de Turk

Ácido acético glacial ----- 20mL

Violeta de genciana ----- 2mL

Água destilada ----- 1L

- Hematoxilina (Reagen)

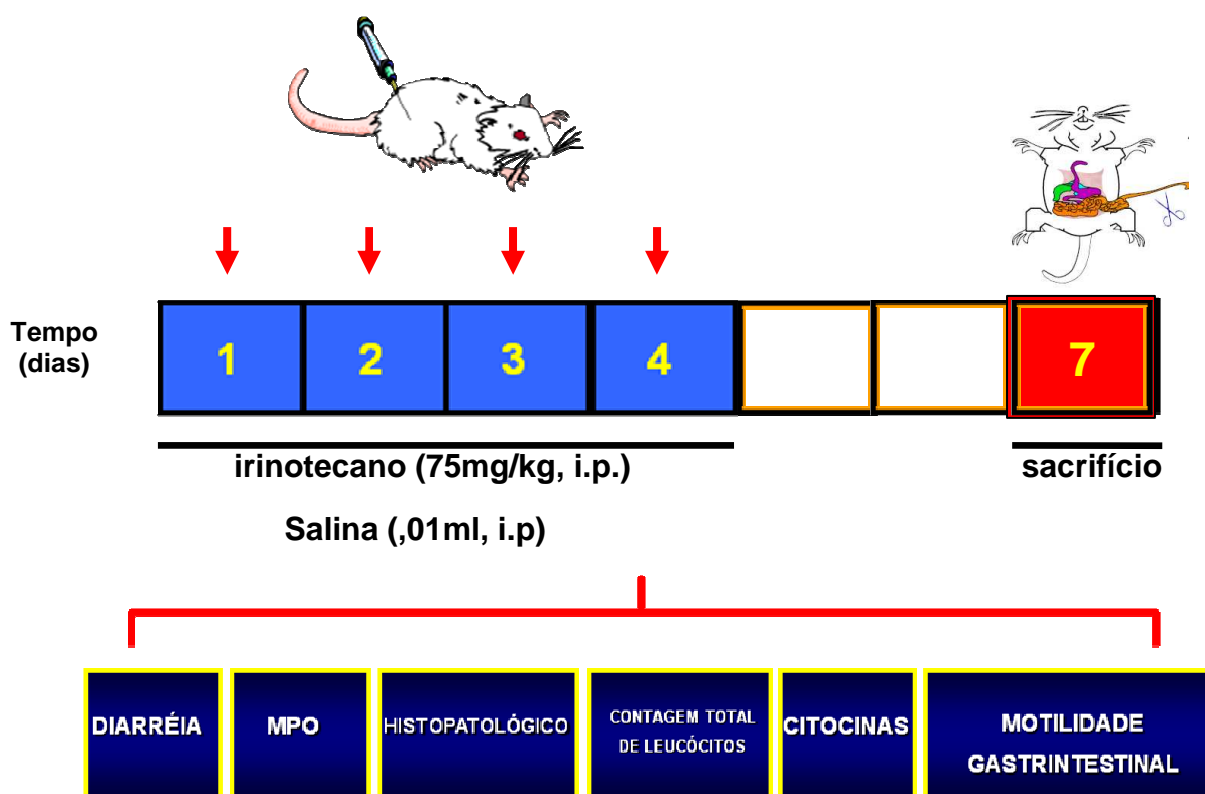
- Eosina (Merck)

- Hematoxilina de Mayer (Reagen)

### 3.3 - MUCOSITE GASTRINTESTINAL POR IRINOTECANO

Foi utilizado o modelo de indução de mucosite intestinal experimental baseado no modelo descrito por *Ikuno et.al.* (1995) e adaptado pelo Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

Os animais receberam uma injeção de irinotecano via intraperitoneal (i.p.), na dose de 75mg/kg durante quatro dias consecutivos e foram sacrificados no sétimo dia experimental para estudo dos aspectos relacionados à mucosite intestinal.



**FIGURA 5 - Desenho esquemático do protocolo da mucosite intestinal experimental.** A mucosite intestinal foi induzida através da administração via i.p.de irinotecano (75mg/kg) durante 4 dias consecutivos. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos de duodeno foram removidos e processados para as análises histopatológicas, morfométrica e avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase, assim como para a dosagem de citocinas KC, IL-1 $\beta$ , IL-10 e TNF- $\alpha$  e avaliação da motilidade gastrointestinal. A diarreia foi avaliada imediatamente antes do sacrifício.



### **3.4 - Grupos Experimentais - 1**

#### **Grupo Controle**

Este grupo foi composto de animais submetidos a administração via (i.p.) de salina a mesma utilizada nos animais pertencente ao grupo experimental.

#### **Grupo Mucosite**

Nesse grupo os animais receberam o tratamento com irinotecano por quatro dias consecutivos por via (i.p). O irinotecano foi diluído em salina 0,9%.

### **3.5 - PARÂMETROS AVALIADOS**

#### **3.5.1 - AVALIAÇÃO DE PARÂMETRO HEMATOLÓGICO**

Os animais foram levemente anestesiados, com éter etílico, e em seguida, coletada amostra periférica de sangue por punção da artéria ocular imediatamente antes do sacrifício. Foram coletados 500µl e dessa quantidade utilizados 20µL de sangue. Esta alíquota foi diluída imediatamente em 380µL de solução de Turk. A contagem total de leucócitos na amostra foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer, conforme metodologia descrita por Moura *et.al* (1998). Os valores foram expressos em número total de leucócito x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>.

#### **3.5.2 - AVALIAÇÃO DO GRAU DA DIARRÉIA APRESENTADA**

Aos eventos de diarréia, apresentados a partir do quinto dia após o início do tratamento dos animais com irinotecano e analisado no sétimo dia experimental, foram atribuídos escores (segundo proposta de Kurita *et.al.*, 2000) como a seguir: 0=fezes com aspecto normal; 1=fezes levemente alteradas pouco umedecidas; 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; 3=fezes úmidas com bastante

sujidade perianal. Esse parâmetro representou um indicativo de mucosite intestinal, uma vez associado à diarreia à mucosite, prática bastante observada na clínica.



**FIGURA 6 - Representação dos graus de diarreia após a administração de irinotecano por quatro dias consecutivos.** À diarreia foram atribuídos escores de acordo com a intensidade. Grau 0 = fezes com aspecto normal; 1=fezes levemente alteradas pouco umedecidas; 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal. (n=6) (LIMA-JUNIOR, 2008)

### **3.5.3 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA E MORFOMETRIA DA MUCOSITE INTESTINAL**

Após o sacrifício dos animais, 1 cm do duodeno dos camundongos foram removidos. A seguir, tais espécimes foram fixados em formol tamponado 10% e processados para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica (40x). A análise histopatológica envolveu a observação do

aspecto de vilos e criptas, assim como presença e intensidade de infiltrado inflamatório. O grau e a gravidade da mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores proposto por Woo *et.al.*, (2000) e descrito a seguir: 0 = ausência de lesão; 1 = menos de 10% das criptas contém células necróticas; 2 = mais de 10% das criptas contém células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta; 3 = mais de 10% das criptas contém células necróticas com perda da arquitetura das criptas (20%). Os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescente; 4 = semelhantes à 3, sendo mais extensa e com perda da arquitetura das criptas e encurtamento dos vilos.

Para a análise morfométrica, a medida de vilos foi verificada considerada desde o ponto de encontro entre dois vilos até o topo do vilo em mensurado (altura do vilo), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre dois vilos medidos até o início da camada submucosa) para a correlação para a capacidade absorptiva (razão da altura de vilo/ profundidade das cripta). A razão entre o comprimento dos vilos intestinais e as criptas de Lieberkühn foi calculada em  $\mu\text{m}$  utilizando-se o software ImageJ versão 1,36, sendo medidos entre 5 e 10 vilos e criptas por corte histológico.

#### **3.5.4 - ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)**

No momento do sacrifício, uma porção do duodeno foi retirada para mensuração da atividade de MPO, segundo método adaptado pelo descrito por Bradley *et.al.* (1982). Esta análise teve a finalidade de avaliar a reação inflamatória de mucosite intestinal induzida por irinotecano, uma vez que esta enzima é marcadora do processo inflamatório medida pelo acúmulo de neutrófilo nos tecidos.

As amostras obtidas foram pesadas e colocadas em 1mL de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio, pH 6,0. Depois foram homogeneizadas em um macerador Politron<sup>®</sup> para lise da célula. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO por U/mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por Bradley et. al. (BRADLEY et. al., 1982), utilizando peróxido de hidrogênio a 1% como substrato da MPO. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1μmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado ocorre a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidine em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como atividade de MPO U/mg de tecido.

### 3.5.5 - DOSAGEM DE CITOCINAS (TNF-A, IL-1B, KC E IL-10)

A produção de citocinas foi determinada utilizando a metodologia de Safieh-Garabedian, 1995. Após o sacrifício dos animais (no 7° dia experimental), foram removidos segmentos do duodeno e estocados em freezer a -70°C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi posteriormente homogenizado e coleta do sobrenadante para dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10, segundo descrito por Safieh-Garabedian *et.al.* A determinação da concentração destas citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme protocolo de Cunha *et. al.*(1993), utilizando kit da R&D system<sup>®</sup>, o qual seguiu as seguintes etapas: (1) incubação com 2  $\mu$ g/mL de anticorpo anti TNF- $\alpha$ , anti IL-1 $\beta$ , anti-KC e anti-IL-10 diluídas em tampão de bicarbonato (PH-8.2) - 100 $\mu$ L/poço (placa de 96 poços) por 16-24 horas a 4°C; (2) lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; (3) bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem 100 $\mu$ L/poço por 2 horas à temperatura ambiente; (4) lavagem da placa (3x); (5) incubação com a curva padrão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10 diluída em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas 100 $\mu$ L/poço por 16-24 horas a 4°C; (6) lavagem da placa (3x); (7) incubação com anticorpo biotilado diluídos 1:1000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro de carneiro por uma hora à temperatura ambiente; (8) lavagem da placa (3x); (9) incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5000 em tampão de lavagem 100 $\mu$ L/poço por 15 minutos a temperatura ambiente; (10) lavagem da placa (3x); (11) incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100 $\mu$ L/poço, cobriu-se a placa deixou-se no escuro por 5-20 minutos à temperatura ambiente (12) a reação foi paralisada com 150  $\mu$ L/poço

de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M; (13) leitura em espectrofômetro a 490nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

### **3.5.6 - Esvaziamento Gástrico, Trânsito Intestinal e Transito GASTRINTESTINAL.**

Os animais foram alocados nos seguintes grupos experimentais Grupo I: Animais tratados com salina; Grupo II: Animais tratados com irinotecano (75mg/kg) por via intraperitoneal. Após 7 dias, foi avaliado o esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e centro geométrico conforme técnica de Miller, 1981. Após 24 horas de jejum, os animais receberam por gavagem (350 $\mu$ L) da refeição teste que consiste de um marcador não absorvível (0,75 mg/mL de solução de vermelho de fenol glicosada a 5%). Decorridos 10, 20 e 30 minutos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após a laparotomia, o estômago e o intestino delgado foram expostos e rapidamente isolados, por ligaduras nas junções esôfago-gástrica, gastro-duodenal e ileo-cecal, e removidos. Após a retirada, o estômago e três porções do intestino (proximal, medial e distal) foram colocados em uma mesa e dividido em tamanhos aproximadamente iguais de 11cm. Cada um destes segmentos foi introduzido num cilindro graduado e o volume total foi aferido através da adição de 10 mL de 0,1 N NaOH. A seguir, os segmentos foram cortados e homogeneizados por 30 s. Após 20 minutos da homogeneização, 1 mL do sobrenadante foi centrifugado por 10 min à 2800 rpm. As proteínas do homogeneizado foram precipitadas através da adição de 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (20%), e novamente centrifugadas por 20 min a 2800 rpm. A seguir, 150  $\mu$ L do sobrenadante serão adicionados a 200  $\mu$ L de 0,5 N de NaOH. A absorbância das amostras foi estabelecida em espectrofotômetro a um comprimento

de onda de 540nm e expresso em densidade óptica (D.O.). A curva padrão foi obtida da medida por espectrofotômetro à 540nm de uma concentração conhecida de vermelho de fenol diluída em 0,1 N NaOH. Após a determinação do coeficiente linear da curva padrão, a concentração da solução ( $C=D.O.$ ) e a quantidade de fenol vermelho ( $m$ ) por cada segmento ( $m = C \times \text{volume}$ ) foram determinados. A retenção gástrica ( $x$ ) foi expressa pela % de acordo com a seguinte equação: Retenção gástrica de corante  $x = (\text{quantidade de vermelho de fenol recuperada do estômago} / \text{quantidade total de vermelho de fenol recuperada nos segmentos do TGI})$ . O trânsito intestinal foi expresso pela %, de acordo com a seguinte fórmula: Retenção de corante em cada segmento intestinal/ quantidade total de vermelho de fenol recuperada em todos os três segmentos intestinais (proximal, medial e distal).

O trânsito gastrintestinal da refeição foi estimado de acordo com o método do centro geométrico (Miller et.al., 1981). De acordo com este princípio, obtivemos o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago - 1, intestino proximal - 2, intestino medial - 3 e intestino distal - 4). A somatória desses valores indica o centro geométrico da refeição propelida ao longo do intestino.

### **3.5.7 – EFEITO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA OU METOCLOPRAMIDA NAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAIS ASSOCIADA À MUCOSITE INTESTINAL POR IRINOTECANO.**

Os animais foram tratados com irinotecano (75mg/kg) do D1-D4 e 30 minutos antes do tratamento com irinotecano receberam o tratamento com dexametasona (2,5mg/kg, s.c.) ou metoclopramida (10mg/kg, i.p.), durante os sete dias consecutivos (D1-D7). Os animais controle negativos foram tratados apenas com salina. No sétimo dia experimental foi avaliado o grau de diarreia e após o sacrifício

foi realizada avaliação dos parâmetros hematológico, morfometria da mucosa intestinal, atividade de mieloperoxidase (MPO), dosagem de IL-1 $\beta$ , esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e trânsito gastrintestinal, conforme descritos anteriormente.

### **3.5.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados estão expressos como média + E.P.M. (variáveis com distribuição normal) ou como mediana  $\pm$  mínima e máximo (variáveis em distribuição normal.). A análise estatística foi feita usando o teste t de Student (comparação entre dois grupos) ou pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Newmann Keuls (quando comparação de mais de dois grupos). Os escores histológicos foram avaliados pelo teste não paramétrico Mann-Whitney. Significância estatística foi observada quando  $p < 0,05$ . Para realização de testes estatísticos foi utilizado o software Prism versão 4 da GraphPad software.



## ***4. Resultados***

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Efeito do tratamento com irinotecano sobre os leucócitos totais, diarreia e mucosite intestinal em camundongos *Swiss*.

Irinotecano induziu significativa leucopenia, diarreia quando comparado com o grupo controle (salina). A mucosite intestinal foi evidenciada no grupo que recebeu apenas Irinotecano, uma vez que os escores histopatológicos atribuídos para o grupo foi de 3 (3-3) apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle. (Tabela 1).

**TABELA 1. Irinotecano induz leucopenia, diarreia e mucosite intestinal.**

Grupo	Leucócitos totais $\times 10^3$ mL	Diarreia	Escore histopatológico
Salina	94,33 $\pm$ 12,40	0 (0-0)	0 (0-0)
Irinotecano	28,89 $\pm$ 3,84*	3 (1-3)*	3 (3-3)*

Os valores representam média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8) para análise de leucócitos totais ( $\times 10^3$ /mL) sendo analisados pelo teste t Student.

A análise dos escores histopatológicos e diarreia são representados por mediana e variação e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. \* $p < 0,05$  quando comparado com o grupo controle.

### 4.2 – Alterações histopatológicas no duodeno induzidas pelo tratamento com irinotecano em camundongos *Swiss*

Nas fotomicrografias (100x) (figura 7 – Painéis A e B), observamos que o tratamento com Irinotecano provocou alterações na mucosa intestinal evidenciada pela perda total de sua arquitetura devido à diminuição da altura de vilos e aprofundamento das criptas (figura 7 – painel B). Observa-se ainda, que no aumento

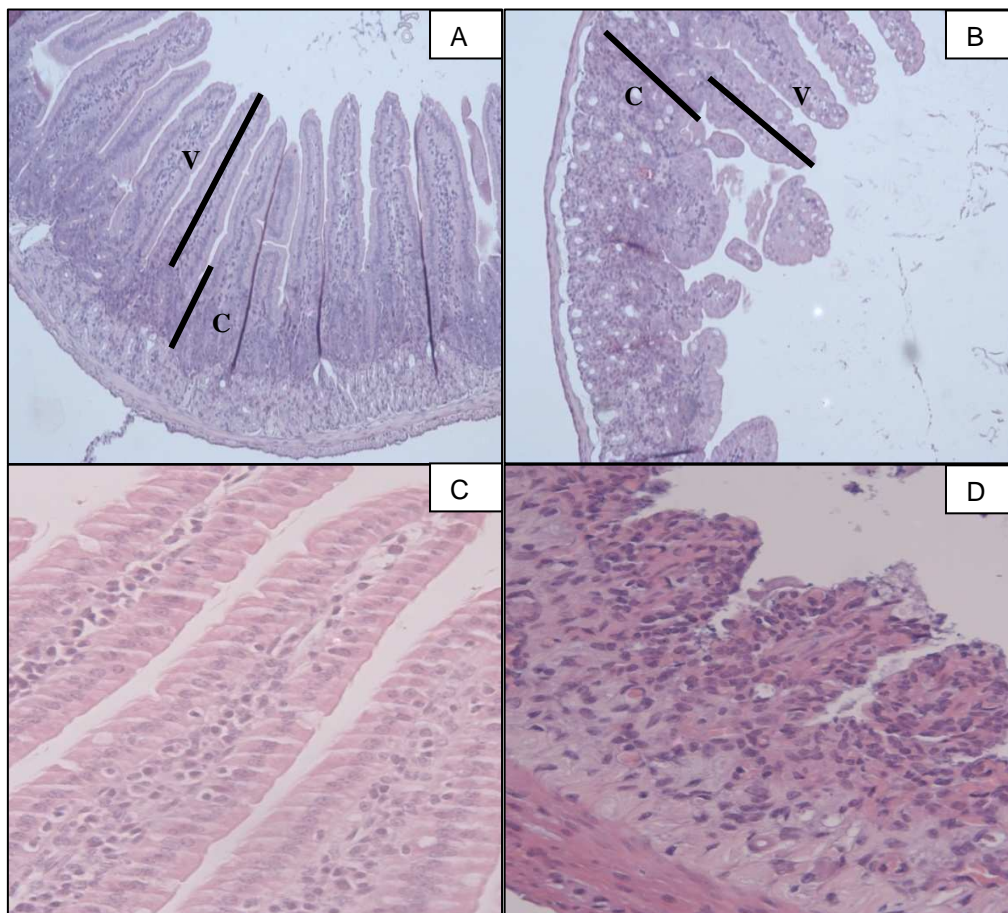
de 400x, ocorre um intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema na mucosa e na muscular observados no grupo tratado com irinotecano (figura 7D), quando comparado com o controle (figura 7C).

#### **4.3 – Alterações morfométricas no duodeno induzidas pelo tratamento com irinotecano em camundongos Swiss**

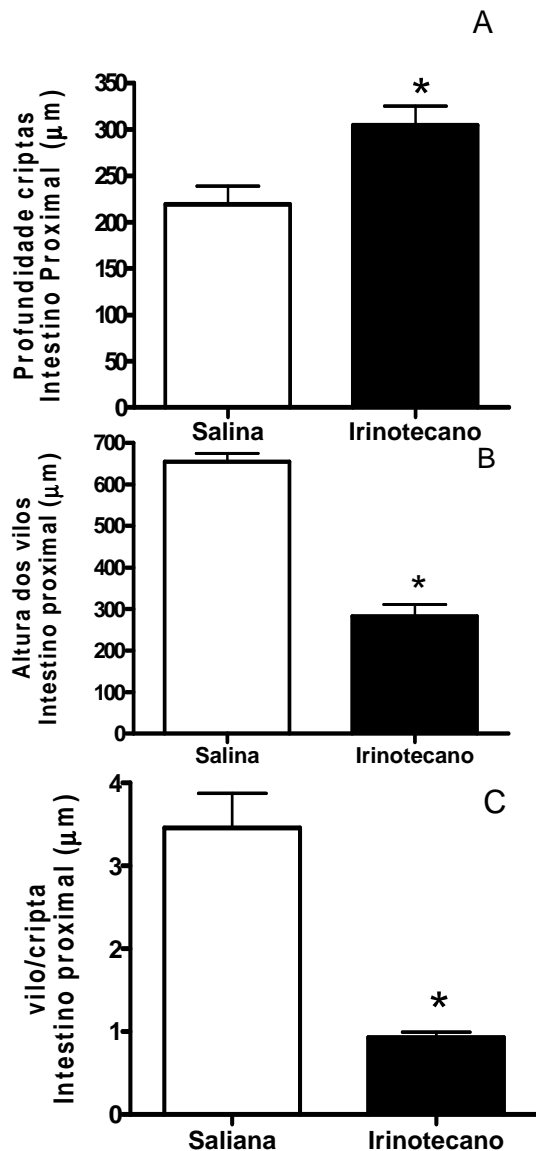
Na figura 8, observamos que o tratamento com irinotecano induziu um aumento na profundidade das criptas (painel A), uma significativa diminuição na altura dos vilos (painel B), e uma diminuição na relação vilo-cripta (painel C), no duodeno, quando comparado ao grupo controle (salina).

#### **4.4 – Aumento da atividade de MPO no duodeno de camundongos Swiss tratados com irinotecano.**

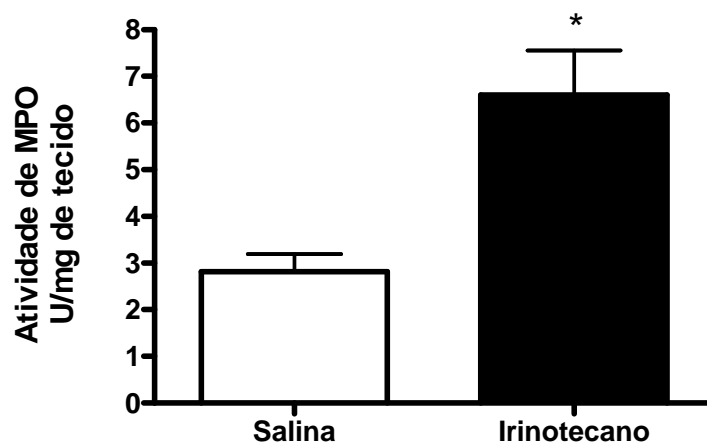
Na figura 9, observamos que no duodeno dos animais que receberam irinotecano houve um aumento significativo da atividade de MPO, quando comparado ao grupo de animais controle (salina).



**FIGURA 7. Fotomicrografia do duodeno de camundongos *swiss* tratados com salina e dos animais submetidos à mucosite intestinal pela administração de irinotecano.** Os animais receberam Irinotecano (75mg/kg) durante 4 dias consecutivos e salina 0,9% por 7 dias, ambas por via intraperitoneal (i.p). No sétimo dia os animais foram sacrificados e o duodeno foi retirado e processado para a técnica de coloração pelo método H&E. (A e B – aumento de 100x, C e D – aumento de 400x) (**Painel 1.A** – Duodeno de animais que receberam apenas salina 0,9%, **Painel 1.B** – Duodeno de animais que receberam Irinotecano). Em **A** observamos a mucosa intestinal de animais normais, ou seja, animais que não foram submetidos à mucosite intestinal, mostrando vilos (V) e criptas (C) preservados. Em **B** observamos a mucosa de animais que receberam irinotecano mostrando a perda da arquitetura da mucosa através do encurtamento dos vilos, vacuolização, necrose de criptas e infiltrado de células mononucleares.



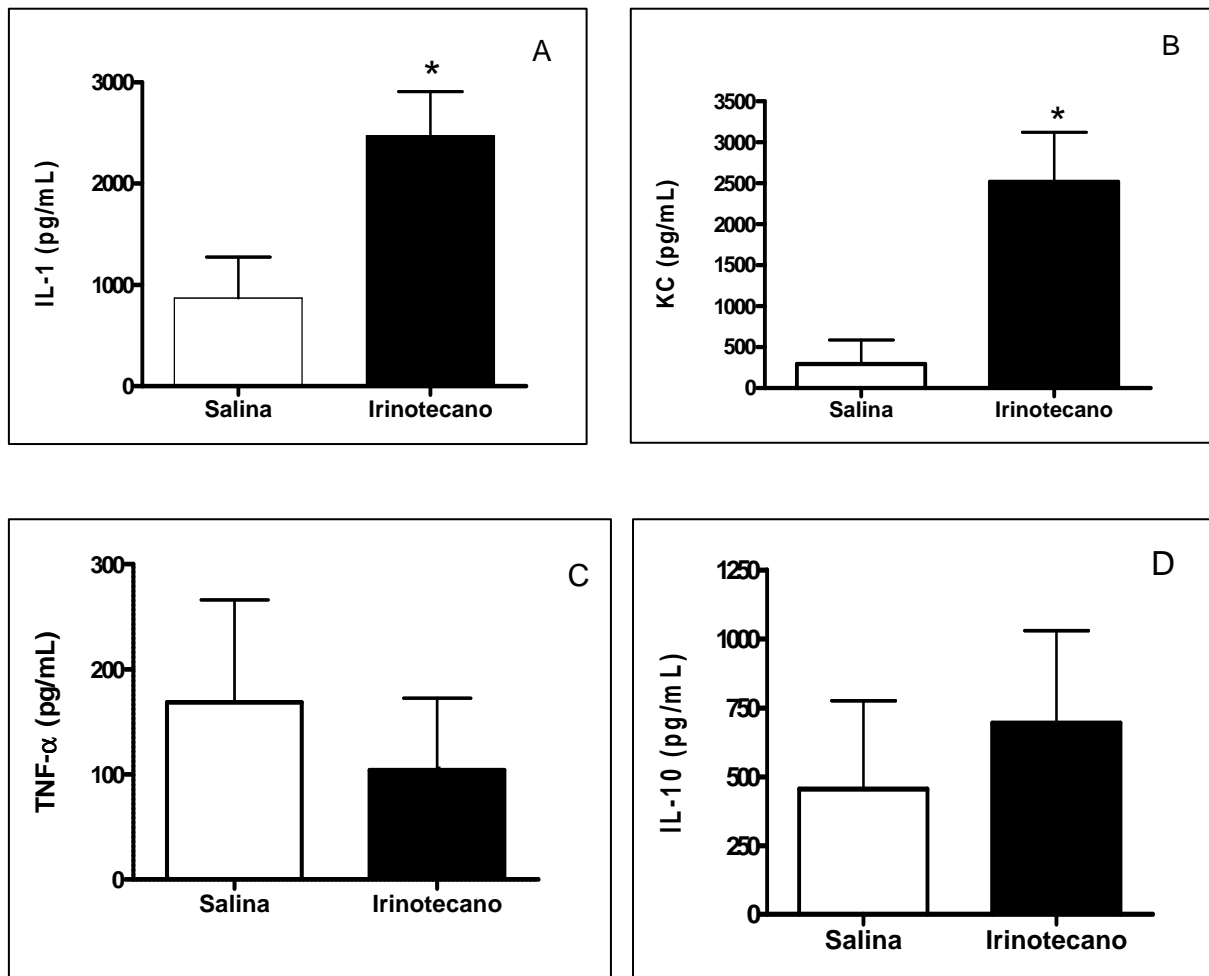
**FIGURA 8. Efeito do tratamento do irinotecano na morfometria duodenal de camundongos Swiss.** Os animais receberam Irinotecano ou salina por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental e uma porção do Intestino proximal (duodeno) foi removido e congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Os segmentos de intestino proximal foram obtidos para a medida da altura dos vilos (painel A), profundidade da criptas (painel B) e razão vilo/cripta (painel C). Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=6-8$ ) \* $p<0,05$  quando comparados com o grupo controle (salina), pelo teste t Student.



**FIGURA 9. Aumento da atividade de MPO no duodeno de camundongos Swiss tratados com irinotecano ou salina.** Animais foram pré-tratados com salina ou irinotecano i.p. durante 4 dias consecutivos, sendo sacrificados no sétimo dia experimental. Amostras de segmentos de duodeno foram obtidos para a realização de ensaio da MPO. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8) \*p<0,05, comparado com o grupo salina.

#### **4.5 – A mucosite intestinal por irinotecano eleva os níveis de IL-1, KC no duodeno de camundongos Swiss.**

Observa-se que o irinotecano induziu um aumento na concentração de IL-1 $\beta$  e KC (figuras 10A e 10B, respectivamente) no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal quando comparados aos animais que receberam apenas o tratamento com salina (controle). Quanto aos níveis de TNF- $\alpha$  (figura 10C) e IL-10 (figura 10D), não foram observadas diferenças significativa em relação ao grupo controle.



**FIGURA 10 - Efeito do tratamento com irinotecano nos níveis de citocinas (IL-1, KC, TNF- $\alpha$  e IL-10) no duodeno de camundongos *Swiss*.** Os animais foram tratados com irinotecano ou salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental e amostras do duodeno foram removidas e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O ensaio foi realizado por ELISA para as citocinas pró-inflamatórias (painel A - IL-1, painel B - KC e painel C - TNF $\alpha$ ) e anti-inflamatória (painel D - IL-10). Os valores representam média  $\pm$  EPM (n=6-8) da quantidade de citocinas (pg/mL) e foram analisados pelo teste t Student. \* Diferença estatística comparados com animais tratados apenas com salina ( $p < 0,05$ ).

#### 4.6 - Esvaziamento gástrico de líquidos em camundongos *Swiss* acordados e tratados com irinotecano.

Na figura 11, observa-se que nos tempos de 10, 20 ou 30 minutos após a refeição, os animais tratados com irinotecano apresentaram um maior atraso no esvaziamento gástrico, quando comparado com o controle que recebeu apenas salina.

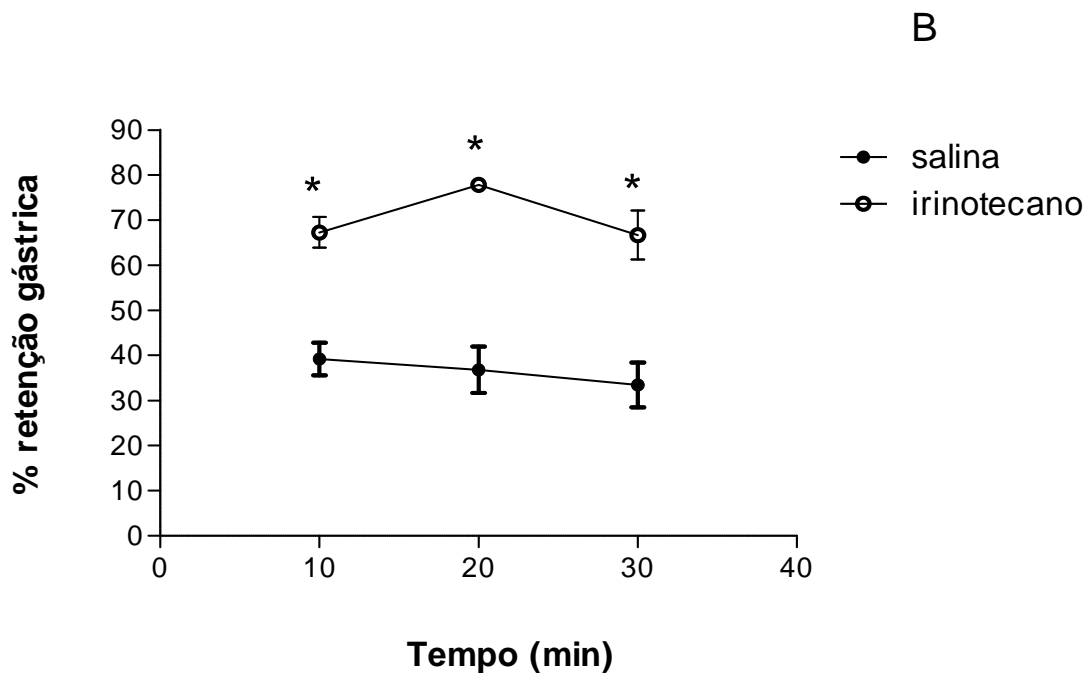
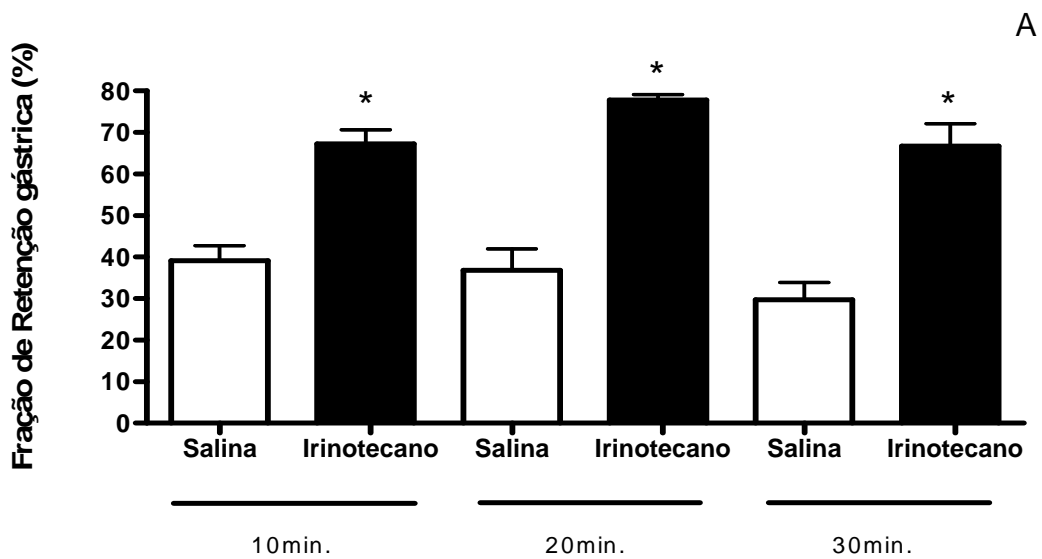
#### **4.7 – Trânsito intestinal da refeição no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.**

Na Figura 12, observamos que o trânsito intestinal nos animais portadores de mucosite por irinotecano apresentou uma maior retenção nos segmentos distais após 10 e 20 minutos da refeição (painéis A e B). Como reflexo deste resultado, observamos que no segmento medial houve uma menor retenção do corante nos mesmos intervalos (painéis A e B) no grupo tratado com irinotecano, quando comparado ao grupo controle salina. Após 30 minutos da refeição (painel C), não observamos diferenças significativas na retenção nos segmentos intestinais do grupo irinotecano em relação ao grupo salina. Em relação ao segmento proximal, apenas no intervalo de 10 minutos, observamos uma maior retenção neste segmento no grupo com mucosite por irinotecano em relação ao grupo tratado apenas com salina (painel A).

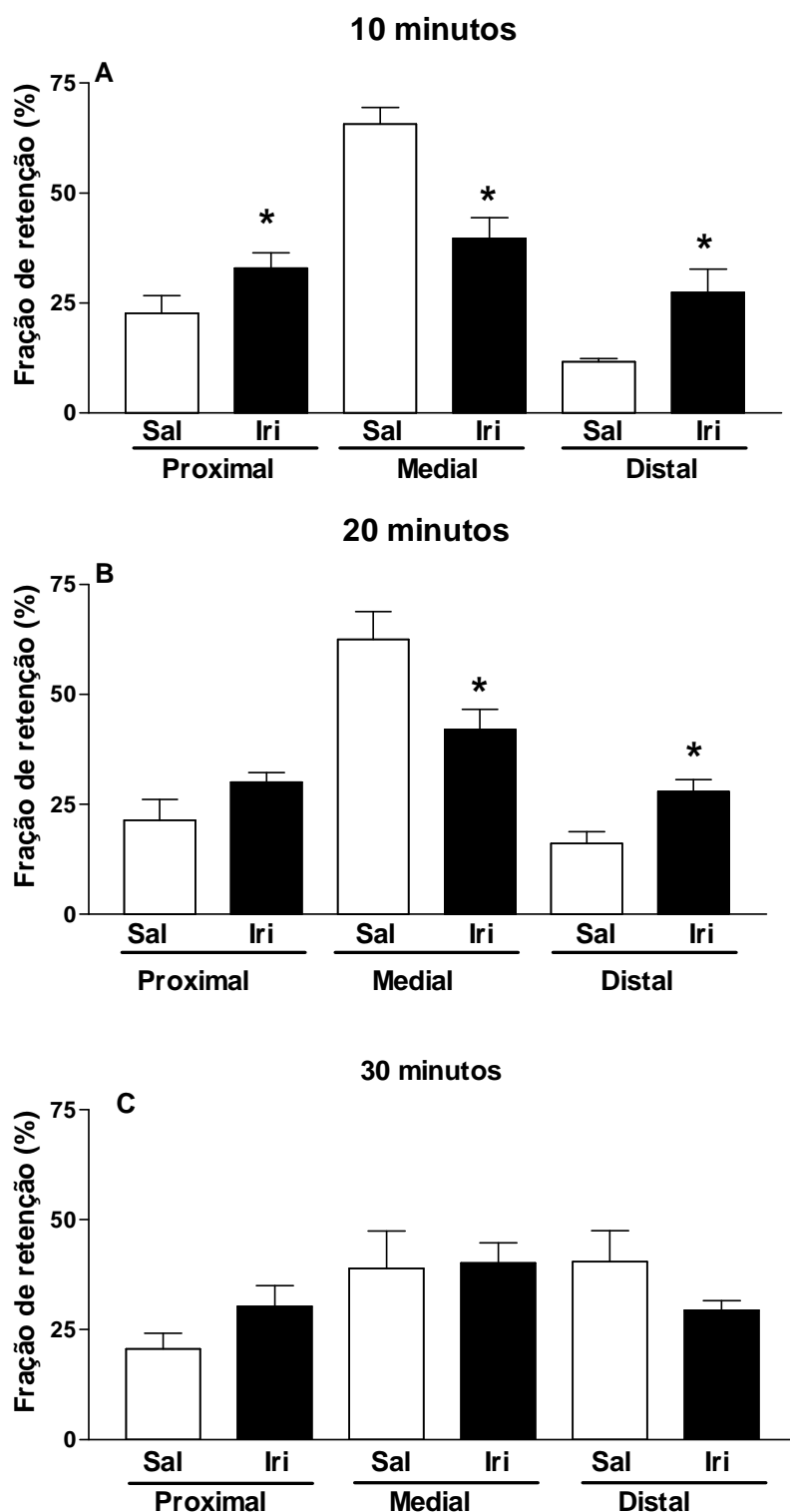
#### **4.8 – Determinação do centro geométrico da refeição no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.**

A fim de avaliar a distribuição da refeição no trato digestório como medida do trânsito gastrintestinal, avaliamos o centro geométrico da refeição. Na figura 13, observamos que a mucosite por irinotecano associou-se com uma distribuição da refeição em segmentos mais proximais nos intervalos de 10, 20 e 30 minutos, quando comparado com o grupo que recebeu apenas salina (controle).

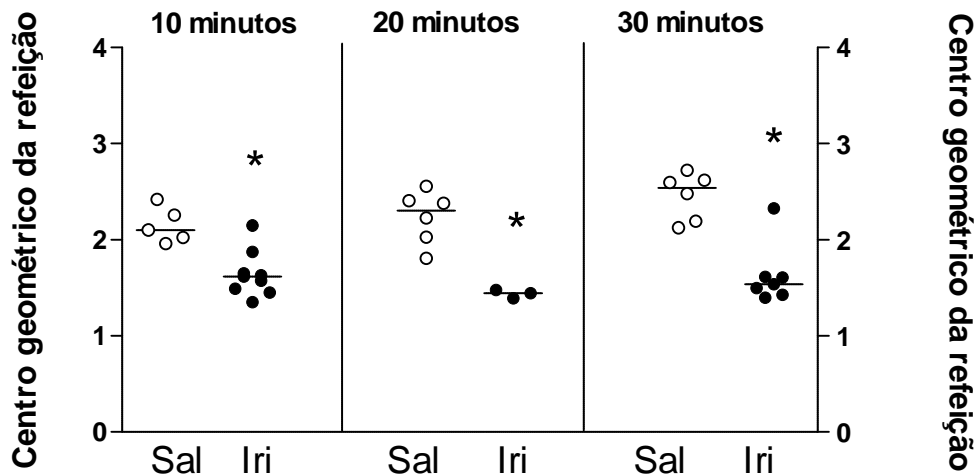




**FIGURA 11. Análise do esvaziamento gástrico de animais tratados com salina e de animais que receberam irinotecano (IRI) avaliado nos tempo de 10, 20 e 30 minutos após a administração de vermelho de fenol.** Após jejum de 12h os animais receberam por gavagem 350 $\mu$ l da refeição (marcador-vermelho de fenol). Decorridos 10, 20 e 30 minutos após a administração do marcador os animais foram sacrificados e o esvaziamento gástrico foi avaliado por espectrofotometria em comprimento de onda 540nm. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=6-8) \* $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (salina), analisados pelo teste t Student. \* Diferença estatística comparados com animais tratados apenas com salina ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 12. Avaliação do trânsito intestinal no curso da mucosite por irinotecano.** Após jejum, os animais receberam por gavagem 350 $\mu$ l da refeição (marcador-vermelho de fenol). Decorridos 10, 20 e 30 minutos após a administração do marcador os animais foram sacrificados e o trânsito intestinal foi avaliado por espectrofotometria. Os valores foram expressos como média  $\pm$  EPM (n=6-8). \*p<0,05 quando comparados com o grupo controle (salina), analisados pelo teste t Student. \* Diferença estatística comparados com animais tratados apenas com salina (p<0,05).



**FIGURA 13. Distribuição da refeição no trato digestório estimada de acordo com o método do centro geométrico (MILLER, *et.al.*, 1981).** De acordo com este princípio, obtivemos o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago 1, proximal 2, medial 3, distal 4) pelo dígito identificador de cada segmento: (1, 2, 3, 4, respectivamente). A somatória desses valores indica o centro geométrico do alimento ao longo do intestino. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8) \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo salina, pelo teste t Student.

#### 4.9 – Efeito do tratamento com dexametasona e metoclopramida sobre a leucopenia e diarreia associados à mucosite por irinotecano.

Dexametasona, mas não metoclopramida, reverteu à diarreia associado a mucosite por irinotecano. Por outro lado, a leucopenia induzida pelo tratamento com irinotecano não foi alterada com o tratamento tanto com dexametasona como com metoclopramida (Tabela 2).

**TABELA 2. Dexametasona reverteu diarreia, mas não a leucopenia, associados à mucosite por irinotecano em camundongos.**

GRUPO	Leucócitos totais x 10 <sup>3</sup> mL	DIARRÉIA
SALINA	94,33 ± 12,40	0 (0-0)
IRINOTECANO	28,89 ± 3,84	3 (1-3)
DEXAMETASONA	43,11 ± 6,26	1 (0-3)**
METOCLOPRAMIDA	33,67 ± 3,68	3 (2-3)

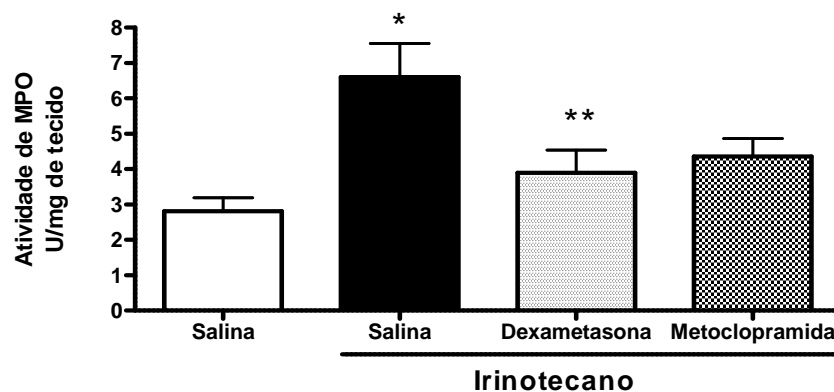
Leucócitos totais: Os valores representam média ± E.P.M. (n=6-8), sendo analisados pelo teste Anova, seguido pelo teste de Bonferonni.

Os escores de diarreia: Os valores são representados por mediana e variação (maior e menor), sendo analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn.

\*\*p<0,05 quando comparado com grupo Irinotecano.

#### **4.10 – Efeito da dexametasona e da metoclopramida sobre a atividade da MPO intestinal em camundongo tratados com irinotecano**

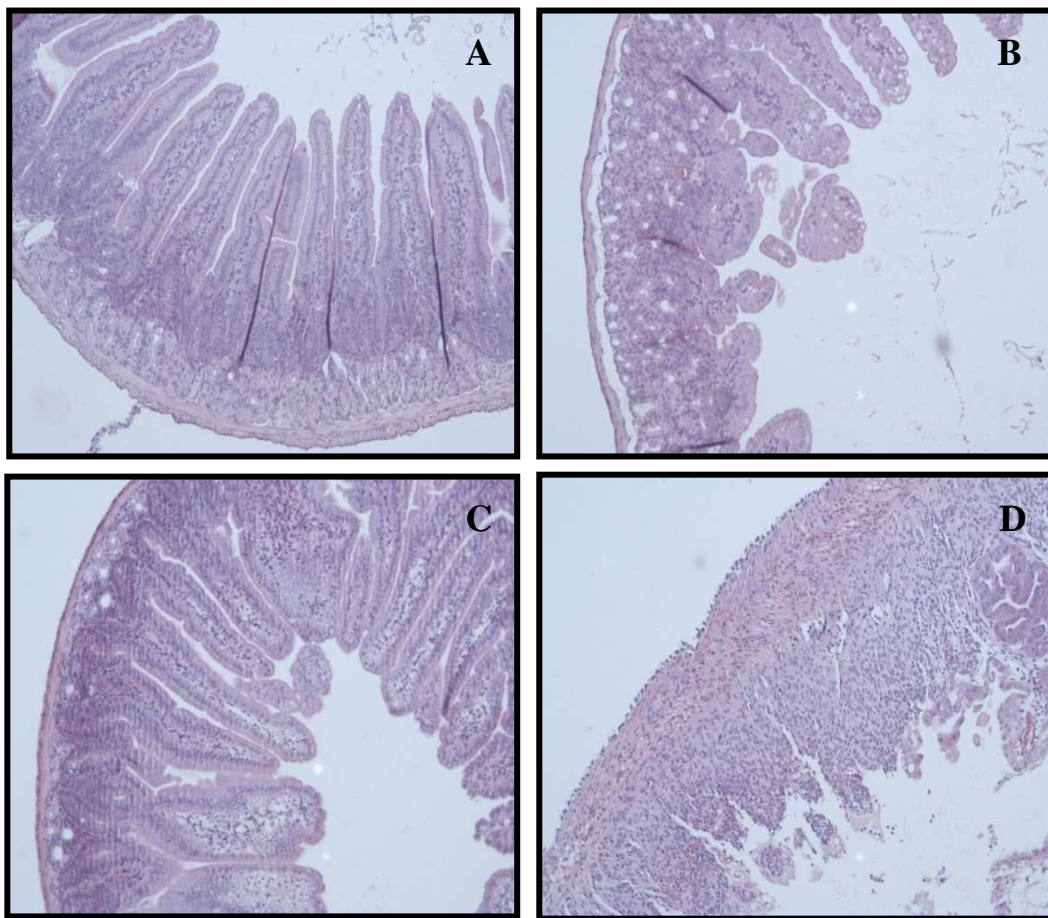
O tratamento com dexametasona reduziu o aumento da atividade de MPO associada à mucosite por irinotecano. Por outro lado, o tratamento com metoclopramida não foi capaz de alterar de maneira significativa alterada o aumento da atividade da MPO observada no curso da mucosite por irinotecano (Figura 8).



**FIGURA 14. Efeito da dexametasona e da metoclopramida sobre a atividade da MPO intestinal em camundongo tratados com irinotecano.** Animais foram pré-tratados com salina ou Irinotecano i.p. durante 4 dias consecutivos. Durante sete dias receberam salina, dexametasona ou metoclopramida e foram sacrificados no sétimo dia experimental. Segmento de duodeno foram obtidos para a realização de ensaio da MPO. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8) \*p<0,05, comparado com o grupo salina e \*\* p<0.05 quando comparado ao grupo irinotecano, teste Anova, seguido pelo teste de Bonferonni.

#### 4.11– Alterações histopatológicas em intestino proximal de camundongos Swiss que receberam irinotecano e tratados com dexametasona ou metoclopramida.

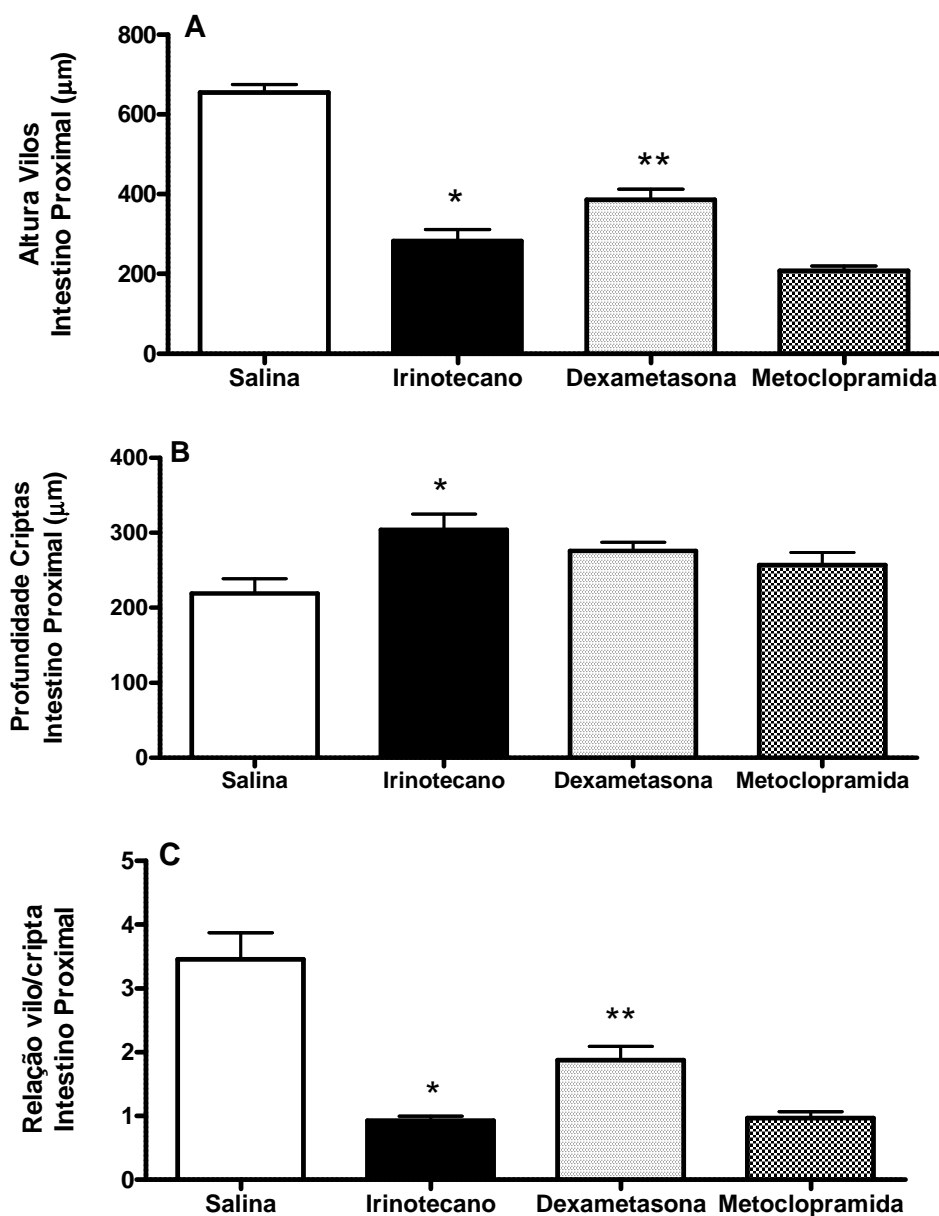
Nas fotomicrografia (100x) (figura 15 -painel 15B), observamos que o tratamento com irinotecano provocou alterações na mucosa intestinal evidenciada pela perda total de sua arquitetura devido à diminuição da altura de vilos (painel 15A) e aprofundamento das criptas (painel 15B). No painel 15C observamos porção do intestino proximal de animais tratados com dexametasona, mostrando a reversão parcial da lesão intestinal induzida pelo irinorecano, através da re-estruturação da altura dos vilos e profundidade das criptas. No painel 15D, observamos ainda que o tratamento com metoclopramida não modificou as alterações histológicas associadas a mucosite por irinotecano.



**FIGURA 15. Fotomicrografia (100x) do duodeno de camundongos controle ou com mucosite intestinal por irinotecano e tratados ou não com dexametasona ou metoclopramida.** Os animais receberam irinotecano (75mg/kg) durante 4 dias consecutivos e salina por 7 dias, ambas por via intraperitoneal (i.p.). A dexametasona (2,5mg/kg s.c.) e a metoclopramida (10mg/kg i.p.) foram administradas por sete dias consecutivos. No sétimo dia os animais foram sacrificados e o duodeno foi retirado e processado para a técnica de coloração pelo método H&E. (A, B, C e D – aumento de 100x) (**Figura 15A** – Duodeno de animais que receberam apenas salina 0,9%, **Figura 15B** – Duodeno de animais que receberam irinotecano, **Figura 15C** – Duodeno de animais que receberam irinotecano e foram tratado com dexametasona e **Figura 15D** - Duodeno de animais que receberam irinotecano e foram tratado com metoclopramida).

#### **4.12 – Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida nas alterações morfométricas observadas na mucosite intestinal por irinotecano em camundongos.**

Na figura 16, observamos que o tratamento com irinotecano induziu uma significativa diminuição na altura dos vilos (painel A), um aumento na profundidade das criptas (painel B), e uma diminuição na relação vilo-cripta (painel C), no duodeno, quando comparado ao grupo controle (salina). Em relação à altura dos vilos, o tratamento com dexametasona, mas não com metoclopramida, reverteu o efeito do irinotecano (painel A). Por outro lado, tanto a dexametasona com a metoclopramida não alteraram o aumento na profundidade das criptas induzidas pelo irinotecano (painel B) Em relação à relação vilo/cripta, observamos que os tratamento com dexametasona, mas não com metoclopramida reverteu significativamente a diminuição desta relação induzida pelo irinotecano (painel C).

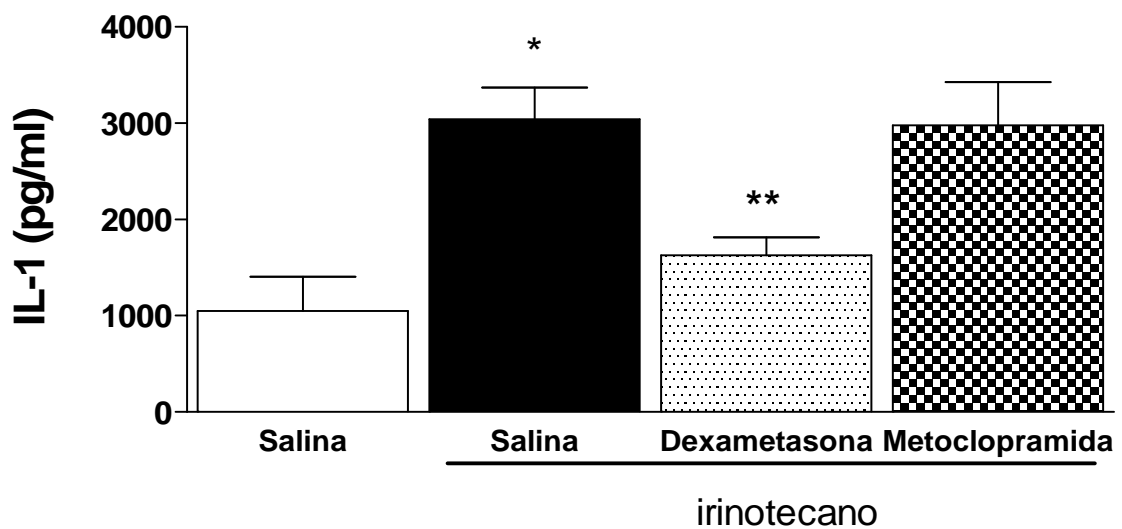


**FIGURA 16.** Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida nas alterações morfométricas no duodeno de camundongos *Swiss*. Animais foram pré-tratados com salina, dexametasona ou metoclopramida sendo sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de intestino proximal foram coletados para medida da altura de vilos (Figura 16A) e profundidade das criptas (Figura 16B). Em 10.C observamos a razão vilo/cripta e os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8). \* $p < 0,05$ , comparado com o grupo salina e \*\*  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo irinotecano, teste Anova, seguido pelo teste de Bonferonni.



**4.13 – O tratamento com dexametasona, mas não metoclopramida, diminui significativamente o aumento do nível de IL-1 no duodeno de camundongos portadores de mucosite intestinal por irinotecano.**

Observa-se que a dexametasona, mas não a metoclopramida, reduziu de forma significativa o aumento dos níveis de IL-1 no duodeno de animais submetido à mucosite intestinal por irinotecano., quando comparado com o grupo que recebeu apenas irinotecano.

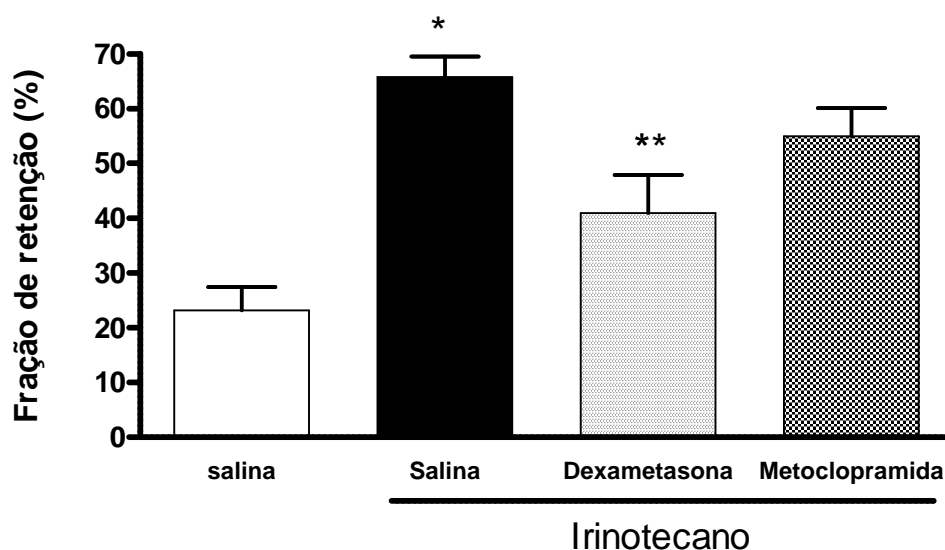


**FIGURA 17 - Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida nos níveis de IL-1 no duodeno de camundongos *Swiss*.** Os animais foram pré-tratados com salina, dexametasona ou metoclopramida sendo sacrificados no sétimo dia experimental, amostras do duodeno foram removidas e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O ensaio foi realizado por ELISA para IL-1. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8) \* $p < 0,05$ , comparado com o grupo salina e \*\*  $p < 0.05$  quando comparado ao grupo irinotecano, teste Anova, seguido pelo teste de Bonferonni.

#### 4.14 – Dexametasona, mas não metoclopramida, reverteu o retarde do esvaziamento gástrico associado à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Na figura 18 observamos que o irinotecano induziu um significativo aumento na retenção gástrica, no tempo de 20 minutos, quando comparado com o grupo controle. Esses achados foram revertidos pelo tratamento com o dexametasona. Por outro lado, não foi verificada nenhuma alteração no esvaziamento gástrico em animais que receberam metoclopramida no curso da mucosite por irinotecano.

Em animais não portadores de mucosite por irinotecano, foi evidenciado que a metoclopramida induziu uma significativa ( $P < 0,05$ ) aceleração no esvaziamento gástrico ( $20,45 \pm 3,50$  %), quando comparado com o animal que recebeu apenas salina ( $30,86 \pm 2,87$  %). Por outro lado, a dexametasona ( $21,08 \pm 1,17$  %) neste grupo de animais, não alterou o esvaziamento gástrico em comparação com o grupo salina ( $19,83 \pm 4,70$  %).



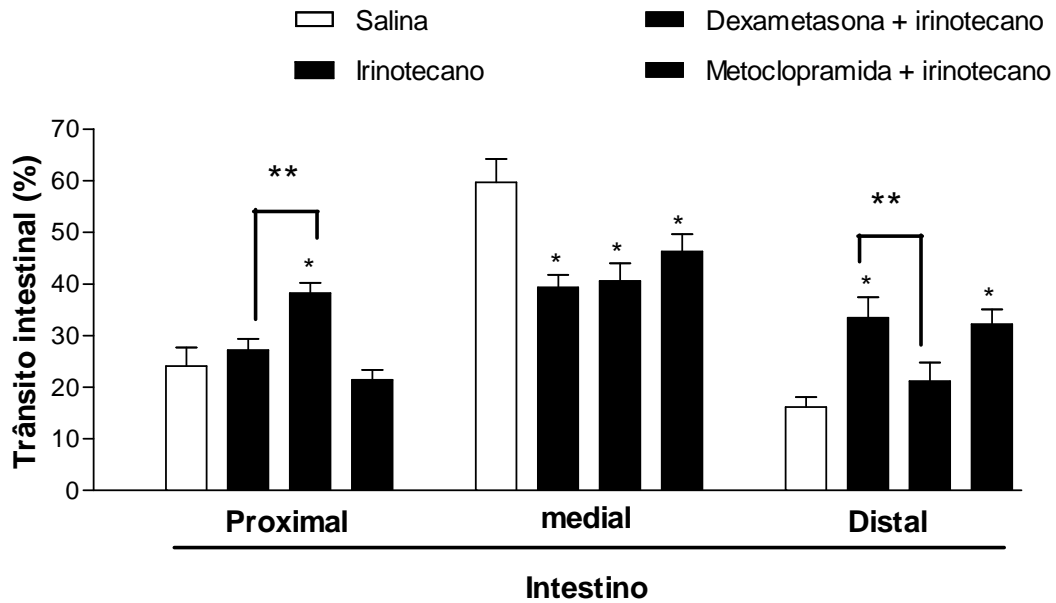
**FIGURA 18. Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida no retarde do esvaziamento gástrico induzido por irinotecano.** Animais foram pré-tratados com salina ou irinotecano e receberam por três dias consecutivos salina, dexametasona ou metoclopramida, sendo avaliado o esvaziamento no sétimo dia experimental. Após jejum de 12h os animais receberam por gavagem 350µl da refeição padrão. Decorridos 20 minutos após a administração do marcador os animais foram sacrificados e o esvaziamento gástrico foi avaliado por espectrofotometria. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n=6-8$ ). \* $p < 0,05$  comparado ao grupo salina e \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo irinotecano, pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni.

#### **4.15 – Dexametasona, mas não metoclopramida, preveniu a aceleração do trânsito Intestinal associado à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

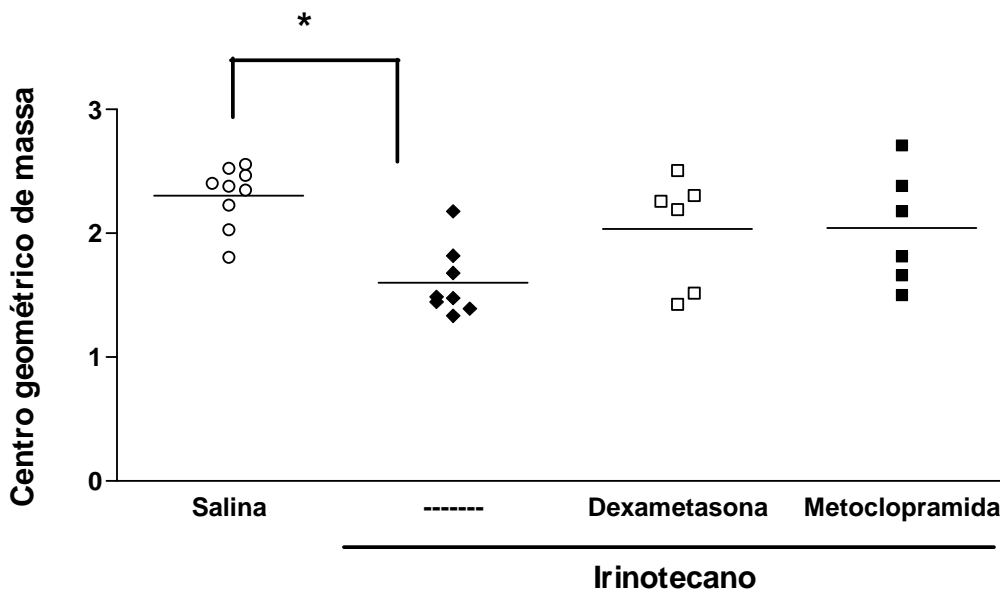
Na Figura 19, observamos uma maior retenção nos segmentos distal e uma menor retenção do corante no segmento medial, para o tempo de minutos, no grupo tratado com irinotecano, quando comparado ao grupo controle salina. Ademais, pode-se observar que o tratamento com dexamestasona reverteu o aumento no trânsito intestinal em animais tratados com Irinotecano, associado com o aumentou na retenção no segmento proximal. Por outro lado, o tratamento com metoclopramida, não alterou o efeito da mucosite por irinotecano sobre o transito intestinal.

#### **4.16 – Determinação do centro geométrico da refeição no curso da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos tratados ou não com dexametasona ou metoclopramida.**

A fim de avaliar a distribuição da refeição no trato digestório como medida do transito gastrintestinal, avaliamos o centro geométrico da refeição. Na figura 14, observamos que a mucosite por irinotecano associou-se com uma distribuição da refeição em segmentos mais proximais nos intervalos de 20 minutos, quando comparado com o grupo que recebeu apenas salina (controle), e que os tratamentos com dexametasona e nem metoclopramida não modificaram este resultado.



**FIGURA 19. Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida sobre a aceleração do transito intestinal observado na mucosite por irinotecano.** Animais foram pré-tratados com salina ou irinotecano e receberam por três dias consecutivos salina, dexametasona ou metoclopramida, sendo avaliado o esvaziamento no sétimo dia experimental. Após jejum de 12h os animais receberam por gavagem 350µl da refeição padrão. Decorridos 20 minutos após a administração do marcador os animais foram sacrificados e o transito intestinal foi avaliado por espectrofotometria. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina e \*\* $p < 0,05$  comparado ao grupo irinotecano, pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni



**FIGURA 20. Efeito do tratamento com dexametasona ou metoclopramida sobre o centro geométrico da refeição na mucosite por irinotecano.** Animais foram pré-tratados com salina ou irinotecano e receberam por três dias consecutivos salina, dexametasona ou metoclopramida, sendo avaliado o esvaziamento no sétimo dia experimental. Após jejum de 12h os animais receberam por gavagem 350µl da refeição padrão. Decorridos 20 minutos após a administração do marcador os animais foram sacrificados e o centro geométrico da refeição foi avaliado por espectrofotometria. Os valores foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n=6-8). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina e pelo teste ANOVA seguido de Bonferroni

## ***5. Discussão***

## 5. DISCUSSÃO

A mucosite, do trato alimentar, está diretamente relacionada com a toxicidade de muitos regimes quimioterápicos e radioterápicos utilizados no tratamento do câncer (Sonis et. a., 2004). Estudos clínicos apontam que o irinotecano associa-se com a incidência de mais de 20% de mucosite intestinal grave (RUBENSTEIN *et.al.*, 2004), podendo chegar a acometer até 40% dos pacientes (ALMONTI *et.al.*, 2004). Esse número pode ainda ser maior, ou seja, pode chegar a 100% em pacientes submetidos a transplante de medula óssea (RUBENSTEIN et al., 2004).

Nosso trabalho tinha como objetivo correlacionar às alterações inflamatórias da mucosa gastrintestinal com as alterações da motilidade digestiva associadas com a mucosite intestinal induzida pelo irinotecano em camundongos, bem como avaliar se a modulação farmacológica do processo inflamatório com o uso de um glicocorticóide poderia reverter essas alterações motoras do trato digestivo.

Inicialmente trabalhamos com apenas 2 grupos, um grupo controle, tratado apenas com salina e um outro que recebeu irinotecano a fim de induzir a mucosite intestinal. Os resultados encontrados mostraram que o irinotecano foi capaz de induzir uma significativa leucopenia e uma diarreia grave, além de gerar uma significativa lesão intestinal, evidenciada pela análise de escores e pela morfometria, quando comparado com o grupo controle. Para a análise da diarreia foi utilizada a proposta de Kurita *et. al.*, 2000 e atribuído grau 3 (maior grau) para os animais que desenvolveram a mucosite intestinal. Já para o grau e a gravidade da mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores proposto por Woo *et.al.*, (2000) e o grupo que recebeu apenas irinotecano apresentou uma mediana de 3 (3-3), por apresentar mais de 10% das criptas com células necróticas e com perda da

arquitetura das criptas em 20% além do encurtamentos dos vilos. Já em relação a morfometria observamos que o tratamento com irinotecano provocou alterações na mucosa intestinal evidenciada pela perda total de sua arquitetura devido à diminuição da altura de vilos, um significativo aumento da profundidade das criptas, assim como uma significativa razão vilo/cripta, além de intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema na mucosa e na muscular quando comparado com o controle.

Nossos resultados corroboram com os dados da literatura, uma vez que a mucosite induzida por agentes quimioterápicos antineoplásicos provoca destruição das células epiteliais e subsequente indução de resposta inflamatória local (SONIS et al., 2004a; RUBEINSTEIN et al., 2004). Recentemente, Melo et.al. (2007) demonstraram que o tratamento com irinotecano (75mg/kg e 100mg/kg) causou significativa mucosite intestinal acompanhada de diarreia e leucopenia.

A fim de avaliar a infiltração de neutrófilos como um marcador do processo inflamatório, utilizamos o ensaio da MPO, onde observamos para o grupo tratado apenas com irinotecano, um significativo aumento da atividade dessa enzima quando comparado com o grupo controle. Ainda avaliando o processo inflamatório realizamos a dosagem de algumas citocinas, IL-1, KC, TNF- $\alpha$ , IL-10, e observamos que a mucosite intestinal por irinotecano eleva os níveis de IL-1 e KC, mas não os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10. Os dados adquiridos no trabalho mais uma vez corroboram com os dados da literatura, que demonstram que a injúria epitelial associada à utilização de quimioterápicos antineoplásicos, geralmente, ocorre com infiltração de neutrófilo para a mucosa intestinal, isso configura a fase inflamatória da mucosite (Sonis et al., 2004) também descrita por Duncan e Grant (2003). Assim a mucosite induzida por antineoplásico provoca destruição das células epiteliais e subsequente indução de resposta inflamatória local (Sonis et.al., 2004; Rubeinstein et al., 2004).



Trabalho realizado em nosso laboratório demonstrou por LUCETTI (2009) que o tratamento com 5-FU induziu um aumento significativo na concentração de TNF -  $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no segmento duodenal de ratos, enquanto Melo (2007) demonstrou que o irinotecano (CPT-11), causa significativa dano à mucosa intestinal, induzindo um aumento significativo na concentração de TNF -  $\alpha$ , IL-1 e KC no segmento duodenal de camundongos, além de Freitas e colaboradores (2007) que demonstraram que a IL-1 $\beta$  possui uma participação no desenvolvimento da mucosite, uma vez que os níveis dessa citocina encontra-se elevado em modelo de mucosite intestinal. De acordo com Lima (2008) em seu trabalho, avaliando os níveis de citocinas em segmentos de duodeno de animais tratados com irinotecano, verificou-se uma elevação nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e do análogo da IL-8 humana em camundongos, KC, mas não de TNF-  $\alpha$  (LIMA-JUNIOR et. al., 2008).

Outros trabalhos observaram que a radioterapia também foi capaz de induzir um aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em modelos animais de mucosite oral (SONIS *et al.*, 2000). Essas evidências mostram a importância de citocinas no desenvolvimento da mucosite gastrintestinal induzida pelo tratamento anticâncer.

Em relação às alterações da motilidade digestiva associadas com a mucosite intestinal induzida pelo irinotecano, nosso trabalho estudou o esvaziamento gástrico e trânsito intestinal, e a fim de avaliarmos a distribuição total da dieta líquida no curso da mucosite por irinotecano, avaliamos o centro de massa, tendo sido observado que a mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos está associada a um significativo retarde no esvaziamento gástrico e uma aceleração do trânsito intestinal para o tempo de 10 minutos (porções proximal, medial e distal) e

para o tempo de 20 minutos (porções medial e distal), além de uma diminuição no trânsito gastrointestinal medido pelo centro geométrico.

O retarde no esvaziamento gástrico observado nos animais tratados com irinotecano pode estar relacionado a um aumento na complacência gástrica e/ou a um aumento na resistência antro-duodenal (HABA; SARNA, 1993). Dados da literatura demonstraram que a inflamação intestinal está associada com anormalidades do controle da motilidade gastrointestinal em modelos de lesão inflamatória (MARTINOLLE *et al.*, 1995; ANNESE *et al.*, 1997; MOREELS *et al.*, 2001; AKIHO *et al.*, 2005). Em relação à aceleração do trânsito intestinal, esta pode ser secundário a um aumento da contração do músculo liso intestinal, o que poderia se correlacionar com a diarreia e a dor abdominal referidas pelos pacientes portadores de mucosite intestinal. Soares *et. al* demonstraram que a mucosite intestinal por 5-FU aumenta a contratilidade induzida por acetilcolina no intestino delgado de ratos e apresenta um retardo no esvaziamento gástrico de líquidos (SOARES *et. al.*, 2008).

Estes nossos dados podem ter uma importância clínica, visto que várias evidências indicam que pacientes submetidos à terapia anticâncer podem sofrer de vários sintomas gastrointestinais, tais como, dispepsia, disfagia e diarreia (RIEZZO *et al.*, 2005). Esse conjunto de sintomas foi denominado síndrome dispéptica associado à quimioterapia do câncer (CADS). Recentemente, dados da literatura sugerem que as desordens da motilidade gastrointestinal podem ser uma das causas de CADS (NELSON *et al.*, 2002, RIEZZO *et al.*, 2005). Entretanto, faltam estudos na tentativa de avaliar terapêuticas eficazes para controlar as alterações da motilidade digestiva, bem como o melhorar os sintomas dos pacientes com CADS.

Na tentativa de estudar se a modulação farmacológica do processo inflamatório poderia reverter as alterações da motilidade digestiva associada à mucosite por irinotecano resolvemos utilizar o tratamento com dexametasona. Tal droga foi escolhida, devido o potente poder antiinflamatório dos glicocorticóides, estes por sua vez, têm seus efeitos geralmente atribuídos à supressão de múltiplas vias sinalizadoras envolvidas na resposta inflamatória levando a uma redução nos níveis de mediadores químicos da inflamação (PGs, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e NO) no sítio da injúria. Essas drogas são responsáveis pela indução da síntese de vários genes, incluindo o gene da anexina I, que inibe a fosfolipase A2 (PLA2), uma enzima responsáveis produção de ácido aracdônico a partir dos fosfolipídios da membrana celular, com posterior ativação das vias das ciclooxigenases, que determina formação de PGs, e pela ativação da via das lipooxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos. Tal mecanismo de ação pode explicar, pelo menos em parte o efeito global desses agentes sobre as células, contribuindo para a redução das conseqüências da resposta inflamatória (CAMERON, 2005; KALL & VECHT, 2004; HIRSCHELMANN et al.,1991; GOLIKOV et al.,1994; STEWART et l.,2002).

Em outro grupo experimental utilizamos o tratamento com metoclopramida, uma droga pró-cinética bastante utilizado na clínica, com a finalidade de amenizar os incômodos gástricos, afim de observar se teria algum efeito sobre o retarde do esvaziamento gástrico e trânsito intestinal ocasionado pelo uso do irinotecano. A metoclopramida, agente procinético, além de suas prpriedades colinomiméticas é um potente antagonista da dopamina. Esse fármaco aumenta a liberação de acetilcolina dos neurônios colinérgicos no plexo mioentérico do sistema nervosos entérico, aumenta a secreção gástrica ou

pancreática. Outra atividade desse fármaco é o de acelerar a depuração esofágica e elevar a pressão do esfícter esofágico inferior, além de acelerar o esvaziamento gástrico e reduzir o tempo de trânsito do intestino delgado (Katzung, 1995).

Conforme apresentado nos resultados, a dexametasona foi capaz de diminuir o grau da diarreia de grau 3 para grau 1, não alterando o poder citotóxico da droga, avaliado pela leucopenia que ainda persistiu após o uso desta. O tratamento com dexametasona ainda foi capaz de melhorar a resposta inflamatória, pela diminuição da atividade da MPO, foi observado ainda uma recuperação da altura dos vilos e da profundidade das criptas. Então, considerando-se que a dexametasona foi efetiva em inibir o processo inflamatório instalado no intestino de camundongos tratados com irinotecano, surgiu a seguinte hipótese: Seria a dexametasona também capaz de inibir a alteração da motilidade digestiva?

Nossos resultados mostraram que a resposta é “sim”, pois a dexametasona gerou significativa redução na retenção gástrica a despeito da administração do irinotecano, bem como no trânsito intestinal, uma vez que a dexametasona foi capaz de prevenir de forma significativa esse fenômeno.

Opostamente à dexametasona, a metoclopramida um medicamento pró cinético utilizado no tratamento de sintomas dispépticos, não apresentou alteração quanto à disfunção gastrintestinais gerados pelo irinotecano. Dessa forma demonstramos que as alterações gastrintestinais, retardo do esvaziamento gástrico e aceleração do trânsito intestinal em camundongos com mucosite intestinal por irinotecano, estão relacionadas diretamente com o processo inflamatório previamente instalado.

Outra possibilidade seria que o efeito da dexametasona fosse secundário a outros efeitos no sistema endócrino, como retenção de água e eletrólitos ou aumento da glicemia, fatores conhecidamente relacionados com alterações da motilidade digestiva (Nobre- Souza MA, 2009 e Graça JR et al, 2000). A fim de avaliar esta possibilidade realizamos experimentos com o tratamento com dexametasona em animais sem mucosite, tendo sido observado que este glicocorticóide não induziu alterações no esvaziamento gástrico, quando comparado com o grupo controle de apenas salina. Este dado corrobora nossa hipótese que a modulação farmacológica da resposta inflamatória induziu uma reversão, mesmo que parcial na dismotilidade associada à mucosite por irinotecano em camundongos.

Ainda foram realizados experimentos com animais não tratados com irinotecano e que receberam apenas dexametasona ou metoclopramida e outro grupo que recebeu apenas salina e observamos que o tratamento isolado com dexametasona não altera o esvaziamento gástrico, enquanto que o uso isolado de metoclopramida foi eficaz em acelerar o trânsito intestinal.

Em relação ao dado da metoclopramida, houve uma surpresa, pois o procinético não foi capaz de acelerar o esvaziamento gástrico no curso da mucosite intestinal por irinotecano. Uma possibilidade seria que a grande disfunção associada ao processo inflamatório levaria a uma perda de controle, sobretudo em neurônios do plexo mioentérico, impossibilitando assim a liberação de acetilcolina secundária a inibição de dopamina induzida pela metoclopramida. Entretanto, para descartar a possibilidade da metoclopramida não está ativa, utilizamos animais sem mucosite intestinal tratados com metoclopramida e

observamos que este fármaco como esperado foi capaz de induzir uma aceleração no esvaziamento gástrico.

Assim, de uma maneira sucinta nossos dados, sugerem que a resposta inflamatória associada à mucosite por irinotecano desencadeia alterações da motilidade digestória como retarde do esvaziamento gástrico e aceleração do trânsito intestinal, que podem estar associada à fisiopatologia da gênese dos sintomas dispépticos e da diarreia presente na mucosite por irinotecano. Ademais demonstramos, pela primeira vez, que drogas antiinflamatórias como os glicocorticóides, mas não drogas procinéticas, podem reverter a dismotilidade associada a mucosite por irinotecano.

Assim, dessa forma, podemos inferir que a dexametasona, mas não a metoclopramida possa ser, no futuro, utilizadas na clínica para diminuir o impacto das alterações gastrintestinais na mucosite por irinotecano, propiciando uma diminuição no atraso do tratamento e/ou até mesmo a suspensão do tratamento.

## **6. *Conclusão***

## 6. CONCLUSÃO

- O tratamento com irinotecano induziu uma leucopenia, diarreia e uma resposta inflamatória no intestino, com destruição da relação vilo-cripta, aumento do infiltrado neutrofílico e da liberação de IL-1 $\beta$  e KC na mucosa intestinal;
- A mucosite por irinotecano desencadeou uma dismotilidade gastrointestinal, com retardo do esvaziamento gástrico, aceleração do trânsito intestinal e um retardo do trânsito gastrointestinal;
- Dexametasona, mas não a metoclopramida, foi capaz de reduzir a resposta inflamatória (reversão parcial da lesão microscópica, diminuição da infiltração neutrofílica, redução da concentração de IL-1 $\beta$ ) e modular parcialmente a dismotilidade gastrointestinal associada à mucosite por irinotecano em camundongos.



## ***7. Referências***

## REFERÊNCIAS

ABIGERGES, D.; ARMAND, J. P.; CHABOT, G. G.; COSTA, L.; FADEL, E.; COTE, C.; HERAIT, P.; GANDIA, D. Irinotecan (CPT-11) high-dose escalation using intensive high-dose loperamide to control diarrhea. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 86, n. 6, p. 446-9, 1994.

ABIGERGES, D.; CHABOT, G. G.; ARMAND, J. P.; HERAIT, P.; GOUYETTE, A.; GANDIA, D. Phase I pharmacologic studies of the camptothecin analog irinotecan administered every 3 weeks in cancer patients. **J. Clin. Oncol.** V.13, n.1, p. 210-21, 1995.

ALIMONTI, A.; GELIBTER, A.; PAVESSE, I.; SATTA, F.; COGNETTI, F.; FERRET, G.; RASIO, D.; VECCHIONE, A.; PALMA, M. D. New approach to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer Treat. Rev.**, v.30, p. 555-562, 2004.

ARIMORI, K.; KUROKI, N.; KUMAMOTO, A.; TANOUE, N.; NAKANO, M.; KUMAZAWA, E.; TOHGO, A.; KIKUCHI, M. Excretion into gastrointestinal tract of irinotecan lactone and carboxylate forms and their pharmacodynamics in rodents. **Pharm. Res.**, v.18, n. 6, 2001.

BARNES P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci** 14: 436-441, 1993.

Bleeker, M. W.; Netea, M.G.; Kullberg, B.J.; Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer JW. **Immunology.** Aug;91(4):548-52, 1997.

Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. **Ann Intern Med.** Dec 15;119(12):1198-208. Review, 1993.

BRADLEY, P. p.; CHRISTENSES, R. D., ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60 (3), p. 618-622, 1982.

CHESTER, J. D.; JOEL, S. P.; CHEESEMAN, S. L.; HALL, G. D.; BRAUN, M. S.; PERRY, J.; DAVIS, T.; BUTTON, C. J.; SEYMOUR, M. T. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus cyclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, n. 6, p. 1125-32, 2003.

CHU, E. Drug development. In: DEVITA Jr., V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. Cancer: principles and practice of oncology, pancreatic cancer. 7 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, Cap. 8, s. 1, p. 195-204, 2005.

COLLINS, S. M. The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. **Gastroenterology.**, v. 111, p. 1683-1699, 1996.

CUNHA, F. CQ.; BOUKILI, M. A.; MOTTA, J. I. B.; VANGAFTING, B. B.; FERREIRA, S. H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 238, p. 47-52, 1993.

DODDS, H. M.; HAAZ, M. C.; RIOU, J. F.; ROBERT, J.; RIVORY, L. P. Identification of a new metabolite of CPT-11 (irinotecan); pharmacological properties and activation to SN-38. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 286, n. 1, p. 578-83, 1998

DODDS, H. M.; BISHOP, J.; J. F.; RIVORY, L. P. More about: irinotecan-related cholinergic syndrome induced by coadministration of oxaliplatin. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, n. 1, 1999.

DODDS, H. M.; HANRAHAN, J.; RIVORY, L. R. The inhibition of acetylcholinesterase by irinotecan and related camptothecin: Key structural properties and experimental variables. **Anticancer Drug Des.**, v. 16, n. 4-5, p. 239-46, 2001.

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

ELTING, L. S.; BODEY, G. P.; KEEFE, B. H. Septicemia e shock syndrome due to viridians streptococci: a case-control study of predisposing factors. **Clin. Infect. Dis.**, 14:1201-1207, 1992.

ENZINGER, P.C.; KULKE, M. H.; CLARK, J. W.; RYAN, D. P.; KIM, H.; EARLE, C. C.; VINCITORE, M. M.; MICHELINI, A. L.; MAYER, R. J.; FUCHS, C. S. A phase II trial of irinotecan in patients with previously untreated advanced esophageal and gastric adenocarcinoma. **Dig. Dis. Sci.**, v.50, n.12, p. 2218-23, 2005.

FLOWER, R.J. Prostaglandins, bioassay and inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.147 Suppl 1, p. S182-92, 2006.

FREITAS, H.C. Envolvimento da interleucina-18 (IL-18) na patogênese da mucosite gastrointestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11). 105f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.,2007.

FUJII, H.; KOSHIYAMA, M.; KONISHI, M. YOSHIDA, K. Intermittent repetitive administration of irinotecan (CPT-11) reduces its side-effects. **Cancer Detect, Prev.**, v. 26, n. 3, p. 210-2, 2002.

GANDIA,D.; ABIGERGES, D.; ARMAND, J.-P.; CHABOT, G.; DA COSTA, L.; DE FORNI, M.; MATHIEU-BOUE, A.; HERAIT, P. CPT-11-induced cholinergic effects in cancer patients (letter). **J. Clin. Oncol.**, v.11, p. 196-7, 1993.

GRAHAME-SMITH D., ARONSON J., **Tratado da farmacologia clínica e farmacoterapia**,3ª edição, Guanabara koogan:48, 12002.

GROSSI, L.; MCHUGH, K.; COLLINS, S. M. On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. **Gastroenterology.**, v. 104, p. 1049-1056, 1993.

GUPTA, E.; WANG, X.; RAMIREZ, J.; RATAIN, M. J.; Modulation of glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, by valproic acid and Phenobarbital. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 39, p. 440-4, 1997.

GUPTA, E.; LESTING, T. M.; MICK, R.; RAMIREZ, J.; VOKES, E. E.; RATAIN, M. J. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlations of glucuronidation with diarrhea. **Cancer Res.**, v. 54, p. 3723-25, 1994.

HAAZ, M. C.; RICHE, C.; RIVORY, L. P.; ROBERT, J. biosynthesis of an aminopiperidino metabolite of irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1piperidino]-carbonyloxycamotocine] by human hepatic microsomes. **Drug metab. Dispos.**, v. 26, p. 769-774, 1998.

HAAZ M. C.; RIVORY, L.; JANTET, S.; RATANASAVANH, D.; ROBERT, J. Glucuronidation of SN-38, the active metabolite of irinotecan, by human hepatic microsomes. **Pharmacol Toxicol.**, v.80, n. 2, p. 91-6, 1997.

HICKOK, J. T., ROSCOE, J. A., MORROW, G. R., KING, D. K.; ATKINS, J. N.; FITCH, T. R. Nausea and emesis remain significant problems of chemotherapy despite prophylaxis with 5-hydroxytryptamine-3 antiemetics. **Cancer.**, v. 97, p. 2880-2886, 2003.

HOSSEINIE, C.; GOLDHILL, J. M.; BOSSONE, C.; PINEIRO-CARRERO, V.; SHEA-DONQHUE, T. Progressive alterations in circular smooth muscle contractility in TNBS-induced colitis in rats. **Neurogastroenterol. Mot.**, v. 11, p. 347-356, 1999.

IKEGAMI, T.; H. A., L.; ARIMORI, K.; LATHAM, P.; KOBAYASHI, K.; CERYAK, S.; MATSUZAKI, Y.; BOUSCAREL, B. Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. **Cancer Res.**, v. 62, n. 1, p. 179-87, 2002.

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

IYER, L.; RAMIREZ, J.; SHEPARD, D. R.; BINGHAN, C. M.; HOSSFELD, D. K.; RATAIN, M. J.; MATER, U. Biliary of irinotecan and metabolites in normal and P-glycoprotein-deficient mice. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 49, p. 336-341, 2002.

KATZUNG, B. G., **Farmacologia básico e clínica**, 6 ed., p. 732-33, 1995.

KEEFE, D. M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 19, p. 323-327, 2001.

KHERER, D. F.; YAMAMOTO, W.; VERWEIJ, J.; DE JONG, M. J.; DE BRUIJN, P.; SPARREBOOM, A. Factors involved in prolongation of the terminal disposition phase of SN-38: clinical and experimental studies. **Clin. Cancer Res.**, v. 6, p. 3451-3458, 2000.

KLASSEN, C.; CASARETT & DOULL'S, **Toxicology The basic science of poisons**, 6ª edição, McGraw-Hill, 49-53, 185, 195, 628-62, 2001.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 46, p. 211-220, 2000.

LANGER, C. J.; Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American Trials. **Oncology**, v. 18, n. 7, p. 17-28, 2004.

LEITÃO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; BELLAGUARDA, E. A.; MACEDO, F. D.; SILVA, L. R.; ORIÁ, R. B.; VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. **Cancer Chemoter Pharmacol.**, v. 59, n. 5, p. 603-12, 2007.

LIMA, V, BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. C.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA M. L. P.; LEITÃO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of the tumor necrosis factor-alfa inhibitors pentoxifyline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamster. **Eur. J. Oral Sci.**; 113 (3): 210-217, 2005.

LIMA-JUNIOR, R. C. P. Estudo morfofuncional e dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos: papel da capase-1, interleucina-18 e óxido nítrico, tese de doutorado), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2008.

MADDENS, S.; CHARRUYER, A.; PLO, i.; DUBREUIL, P.; BERGER, S., SALLES, B.; LAURENT, G.; JAFFREZOU, J. P. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood**, 100: 11294-1301, 2002.

MATHIJESSEN, R. H. J.; JONG, F. A.; VAN SCHAİK, R. H. N.; LEPPER, E. R.; FRIBERG, L. E.; RIETVELD, T.; BRUIJN, P.; GRAVELAND, W. J.; FIGG, W. D.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 96, n. 21, p. 1585-92, 2004.

MELO, M. L.; BRITO, G. A.; SOARES, R. C.; CARVALHO, S. B.; SILVA, J. V.; SOARES, P. M.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Role of cytokines (TNF-alpha, Il-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-Induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifyline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.61, n. 5, p. 775-84, 2008.

MOURA, R. A., WADA, C. S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. Estudo dos elementos figurados do sangue. Inc: **Técnica de laboratório**. 3. São Paulo: Editora Atheneu, Cap. 32, p. 343-74, 1998.

OSSWALD W., GUIMARÃES S., Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas, 4ª Edição, Porto Editora, Lisboa, (49): 716-718, 2001.

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

PIZZOLATO, F. Z.; SDALTZ, L. B. The camptothecins . **Lancet**, v. 361, p. 2235-42, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Quimioterapia do cancer. In: Farmacologia. 4 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan, cap. 42, p. 557-75. 2001.

RIBRAG, V.; KOSCIELNY, S.; VANTELON, J. M.; FERME, C.; RIDELLER, K.; CARDE, P.; BOURHIS, J. H.; MUNCK, J. N.; Phase II of irinotecan (CPT-11) in relapsed or refractory non-hodgkin's lymphomas. **Leuk. Lymphoma**, v.44, n. 9, p. 1529-33, 2003.

RIEZZO, G.; CHILOIRO, M.; RUSSO, F.; CLEMENTE, C.; DI MATTEO, G.; GUERRA, V.; DI LEO, A. Gastric electrical activity and gastrointestinal hormones in dyspeptic patients. **Digestion**, v. 63 (1) p. 20-29, 2001.

RIEZZO, G.; CLEMENTE, C.; LEO, S.; RUSSO, F. The role of eletrogastrography and gastrointestinal hoemones in chemotherapy-related dyspeptic symptoms. **J. Gastroenteroil**., v. 40, p. 1107-1115, 2005.

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

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

ROTH, B. L.; SLEDGE, G. W. J., WILLIAN, S. D., MEYER, S. C., ANSARI, R., FISHER, W. B. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin in metastatic. **Cancer**, 68(2): 248-252, 1991.

RUBEINSTEIN, E. B., PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; KEEFE. D.; McGUIRE, D.; EPSTEIN, M J.; ELTING, L. S.; FOX, P. C.; COOKSLEY, C.; SONIS, S. T. Clinical

practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100, suppl. 9, p. 2026-46, 2004.

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

SALIBA, F.; HAGIPANTELLI, R.; MISSET, J. L.; BASTIAN, G.; VASSAL, G.; BONNAY, M.; HERAIT, P.; COTE, C.; MAHJOUBI, M.; MIGNARD, D.; CVITKOVIC, E. Pathophysiology and therapy of irinotecan-induced delayed-onset diarrhea in patients with advanced colorectal cancer: a prospective assessment. **J. Clin. Oncol.** V. 16, n. 8, p. 2745-51, 1998.

SALTZ, L. B.; DOUILLARD, J. Y.; PIROTTA, N.; ALAKL, M. GRUIA, G.; AWAD, L.; ELFRING, G. L.; LOCKER, P. K.; MILLER, L. L. Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. **Oncologist**, v.6, n.1, p. 81-91, 2001.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy and radiochemotherapy. part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis. **HEAD NECK.**, 25(12); 1057-1070, 2003.

SCULLY, C.; EPSTEIN, J.; SONIS, S. Oral mucositis: a challenging complication of radiotherapy, chemotherapy and radiochemotherapy. part 2, diagnosis and management of mucositis. **HEAD NECK.**, 26(1); 77-84, 2004.

SCULLY, C.; SONIS, S.; DIZ, P. D. Oral mucositis. **Oral Dis.**, 12(3) & SONIS, 2006.

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

SONIS, S. T.; FAY, E. G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**. 16: 680-686, 2002.

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

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, K.; ONOSE, S.; YOSHIDA, S.; KUMAZAWA, E.; NAGAI, E.; KAMATAKI, T. Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (CPT-11)-induced delayed diarrhea. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 25, p. 1-10, 2006.

TAKIMOTO, C. H.; ARBUCK, S. G.; Topoisomerase I targeting agents: the camptothecins: In: CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer Chemotherapy and biotherapy: principles and practice**. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. Cap. 20, p. 579-646, 2001.

WALL, M. E.; WANI, M. C.; COOK, C. E.; PALMER, K. H.; MCPHAIL, A. T.; SIM, G. A. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 88, n. 16, p. 3888-90, 1966.

WOO, P. C.; NG, W. F.; LEUNG, H. C.; TSOI, H. W.; YUEN, K. Y.; Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacol Res**, v. 41, n. 5, p. 527-32, 2000.

XIE, R.; MATHIJSEN, R. H. J.; SPARREBOOM, A.; VERWEIJ, J.; KARLSSON, M. O. Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 72, n. 3, p. 265-75, 2002.



## **8. Anexo**



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 para os devidos fins que o Projeto Intitulado”  
Modulação da resposta inflamatória com Dexametasona reversa  
a dismotilidade antitricinof mediada à M. Intestinal Induzida por IR/Ascaris de <sup>em grande go</sup>  
responsabilidade do Pesquisador Prof. Dr. Marcelle Henriques L.P. de Souza deu entrada  
para ser avaliado pelo a Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), no  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, recebendo o protocolo nº 63 no dia  
15/05/09.

Fortaleza, 15 de maio de 2009

  
Joana Barbosa Carvalho  
Secretária