



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**DANIELY VIANA DA SILVA COSTA**

**O EFEITO DO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO NA MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL POR IRINOTECANO**

**FORTALEZA**

**2017**

DANIELY VIANA DA SILVA COSTA

**O EFEITO DO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO NA MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL POR IRINOTECANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e tecidual.  
Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza.

**FORTALEZA  
2017**

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

---

Costa, Daniely Viana da Silva

O efeito do ácido alfa-lipóico na mucosite intestinal experimental por irinotecano/ Daniely Viana da Silva Costa- 2017. f: il. Color., enc.; 30 cm.

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2017.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientação: Emmanuel Prata de Souza .

1. Mucosite intestinal 2. Irinotecano 3. Ácido alfa-lipóico 4. Inflamação 6. Diarreia

---

DANIELY VIANA DA SILVA COSTA

**O EFEITO DO ÁCIDO ALFA-LIPÓICO NA MUCOSITE INTESTINAL  
EXPERIMENTAL POR IRINOTECANO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Biologia celular e tecidual.  
Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Á Deus,

Por ter me abençoado e iluminado ao longo  
dessa caminhada.

Aos meus pais Onofre Maciel (1964-2013) e  
Maria José Viana,

Por terem me ensinado a ser uma pessoa feliz  
apesar de tantos obstáculos e dificuldades que  
proporcionaram meu crescimento.

Ás minhas irmãs Deiziane Viana e Darlyane  
Viana,

Por serem minhas grandes amigas a quem  
dedico parte da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Emmanuel Prata de Souza, por aceitar me orientar e por toda a paciência que teve comigo ao longo do mestrado.

À Professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito, por ter contribuído com o financiamento desse projeto e pela força que vem dando para o desenvolvimento desse projeto.

À minha irmã a Doutoranda Deiziane Viana da Silva Costa por ter me ensinado e apoiado ao longo dessa caminhada. Além de sua contribuição com os experimentos que foram fundamentais.

À professora Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos por ter contribuído com o financiamento desse projeto, fornecendo o ácido lipóico, além de ter acreditado no desenvolvimento do mesmo, estabelecendo uma excelente parceria.

À doutoranda Caren Nádia Soares de Sousa e discente de iniciação científica Ingrid por sempre estarem sempre disponível quando foi necessário e por terem estabelecido essa parceria que foi importante para o desenvolvimento desse projeto.

À doutoranda Conceição da Silva Martins, à mestranda Dainesy Santos Martins e à discente de iniciação científica Angeline Maria Pascoal Holanda da Silva por participarem ativamente dos experimentos, pela amizade e apoio constante.

Aos alunos de iniciação científica Ana Luiza Viana Pequeno, Márcio Flávio Araújo Guanabara Júnior, Gutierrez Bernardo de Freitas e Lauro Inácio de Moura Neto por participarem dos experimentos quando foi necessário.

Aos amigos de pós-graduação Camila Naiane de Carvalho Lima, Ana Paula Fragoso de Freitas pela amizade nessa caminhada.

Às técnicas de laboratório Maria do Socorro França Monte, Flávia de Araújo Silva e Adalberto Junior pela confecção das lâminas histológicas e apoio diário.

À secretária Laisa Albuquerque Bandeira do programa de pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará pela ajuda nas burocracias da dissertação.

Ao Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares e Prof. Dr. Ricardo Lima de Freitas por aceitarem a participar da minha banca de qualificação e defesa do mestrado e por contribuírem para o aperfeiçoamento dessa dissertação.

“Tudo posso naquele que me fortalece”  
(Filipenses – cap. 04, versículo 13)

## RESUMO

### O efeito do ácido alfa-lipóico na mucosite intestinal experimental por irinotecano

O irinotecano é largamente usado no tratamento de câncer colorretal. No entanto, promove mucosite intestinal e alterações da motilidade. A mucosite atinge cerca de 40% dos pacientes em tratamento com irinotecano e há relatos de pacientes que a apresentam na primeira dose administrada. Em adição, a diarreia tardia é um dos grandes problemas enfrentados pelos pacientes em uso desse quimioterápico. Nesse contexto, diversos estudos vêm explorando o efeito de diversas substâncias na prevenção da mucosite e da diarreia induzidas por irinotecano, porém não há evidências de pesquisas com ácido alfa-lipóico (ALA) nessa área. O ALA tem demonstrado importante efeito na prevenção de alterações da motilidade induzida pela colite experimental, além de ter importante efeito na modulação da neuroinflamação em diversos modelos experimentais como a depressão. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do ALA na mucosite intestinal experimental por irinotecano. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo de nº 31/2016. Camundongos Swiss machos (25 a 30 g) receberam salina (0,9%, i.p.) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p.) uma vez ao dia durante quatro dias. No entanto, uma hora antes injetou-se ALA (50, 100 ou 200 mg/kg, gavagem). Os animais foram eutanasiados por decapitação no quinto ou no sétimo dia do protocolo experimental. No quinto dia, os segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram removidos para análise da atividade da acetilcolinesterase, das alterações histopatológica, dos níveis de MPO, GSH e citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ), incluindo da expressão de IL-1 $\beta$  e de Ki67 por imunohistoquímica. No sétimo dia, avaliaram-se o escore de diarreia, o esvaziamento gástrico, o trânsito intestinal e alterações do comprimento do intestino delgado. Além disso, os animais foram acompanhados diariamente para análise da massa corporal e da sobrevida. Irinotecano diminuiu a altura das vilosidades intestinais, causou perda da arquitetura das criptas intestinais e formação de intenso infiltrado de células inflamatórias em segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo). Além disso, reduziu ( $p < 0,05$ ) a expressão de Ki67 nas criptas intestinais, aumentou ( $P < 0,05$ ) os níveis de MPO, IL-6 e TNF- $\alpha$  e diminuiu ( $P < 0,05$ ) o de GSH em segmentos do duodeno. Irinotecano também aumentou ( $P < 0,0001$ ) a retenção da refeição teste (vermelho de fenol) no estômago e a diminuiu ( $P < 0,0001$ ) no segmento medial do intestino delgado, indicando retardo do esvaziamento gástrico e aumento do trânsito intestinal respectivamente. Em adição, irinotecano diminuiu a massa corporea e a sobrevida dos animais submetidos à mucosite intestinal experimental comparado ao grupo controle. Enquanto que o pré-tratamento com ALA (200 mg/kg) foi capaz de prevenir essas alterações induzidas por irinotecano no duodeno. Além disso, ALA diminuiu a diarreia e as alterações na motilidade intestinal e aumentou a sobrevida de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Constatou-se que irinotecano diminuiu a atividade da acetilcolinesterase apenas no jejuno. Ao passo que ALA não reverteu esse efeito em nenhum dos segmentos avaliados. Com base nos resultados, ALA reduz a inflamação, a dismotilidade intestinal e a diarreia induzidas por irinotecano, bem como melhora a sobrevida dos animais tratados com esse quimioterápico. ALA pode ser um importante agente terapêutico para prevenir a dismotilidade intestinal em pacientes sob tratamento com irinotecano.

**Palavras-chave:** Mucosite intestinal. Irinotecano. Ácido alfa-lipóico. Inflamação. Diarreia.

## ABSTRACT

### **The effect of the alpha-lipoic acid in irinotecan-induced intestinal mucositis**

Irinotecan is widely used in the treatment of colorectal cancer. However, it promotes intestinal mucositis and changes on intestine motility. Mucositis affects approximately 40% of patients receiving irinotecan and there are reports of patients presenting with the first dose administered. In addition, late diarrhea is one of the major problems presented by patients using this chemotherapy. In this context, several studies have investigated the effect of several substances on the prevention of irinotecan-induced mucositis and diarrhea, but there is no evidence of alpha-lipoic acid (ALA) studies in this area. ALA has showed an important effect on the prevention of alterations in motility induced by experimental colitis and has an important effect on the modulation of the neuroinflammation in several experimental models, such as depression. Thus, the objective of this study was to investigate the effect of ALA on experimental intestinal mucositis by irinotecan. This study was approved by the animal research ethics committee of the Federal University of Ceará (protocol n°. 31/2016). Male Swiss mice (25 to 30 g) received saline (0.9%, i.p.) or irinotecan (75 mg/kg, i.p.) once daily for four days. However, ALA (50, 100 or 200 mg / kg, gavage) was injected one hour prior of the irinotecan or saline. The animals were euthanized by decapitation on the fifth or seventh day of the experimental protocol. On the fifth day, segments of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) were removed for analysis of histopathological changes, levels of MPO, GSH and proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- $\alpha$ ), including expression of IL-1 $\beta$  and Ki67 by immunohistochemistry. On the seventh day, the diarrhea score, the gastric emptying, the intestinal transit and changes in the length of the small intestine (as an indirect measure of intestinal hypercontractility) were evaluated. In addition, the animals were monitored daily for body mass and survival analysis. Irinotecan decreased the height of intestinal villi, caused loss of intestinal crypt architecture and induced formation of intense inflammatory cell infiltration into segments of the small intestine (duodenum, jejunum, and ileum). In addition, it reduced ( $P < 0.05$ ) Ki67 expression in intestinal crypts, increased ( $P < 0.05$ ) MPO, IL-6 and TNF- $\alpha$  levels and decreased ( $P < 0.05$ ) GSH levels in duodenum segments. Irinotecan also increased ( $P < 0.0001$ ) retention of the test meal (phenol red) in the stomach and decreased it ( $P < 0.0001$ ) in the medial segment of the small intestine, indicating delayed gastric emptying and increased intestinal transit respectively. In addition, irinotecan reduced the body mass and survival of the animals submitted to intestinal mucositis induced by irinotecan compared to control group. The pretreatment with ALA (200 mg/kg) prevented these irinotecan-induced changes in the duodenum. In addition, ALA decreased diarrhea and changes in intestinal motility and increased survival of animals undergoing the irinotecan-induced intestinal mucositis. ALA reduces the inflammation, intestinal dysmotility and diarrhea induced by irinotecan, as well as improves the survival of the animals treated with this chemotherapeutic. ALA may be an important therapeutic agent to prevent intestinal dysmotility in patients receiving irinotecan.

**Keywords:** Intestinal mucositis. Irinotecan. Alpha-lipoic acid. Inflammation. Diarrhea.

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	- Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer.....	32
Tabela 1	- Efeito do ALA no escore histopatológico de segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	43

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- <i>Camptotheca acuminata</i> .....	17
Figura 2	- Estrutura do irinotecano.....	18
Figura 3	- Metabolismo do Irinotecano.....	19
Figura 4	- Patogênese da lesão intestinal induzida por irinotecano.....	21
Figura 5	- Estutura química do ácido lipóico (A) e do ácido dihidrolipóico (B).....	24
Figura 6	- Esquema de indução da mucosite intestinal induzida por irinotecano e protocolo experimental.....	31
Figura 7	Representação esquemática dos escores de diarreia descrito por Kurita <i>et al.</i> (2000).....	35
Figura 8	- ALA reduz a perda de peso em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	39
Figura 9	- Efeito do ALA na sobrevivência de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	41
Figura 10	- Efeito do ALA nas alterações histológicas do intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	44
Figura 11	- ALA aumenta o comprimento das vilosidades, profundidade das criptas e razão vilo-cripta do duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	45
Figura 12	- ALA aumenta os níveis de GSH no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	47
Figura 13	- ALA reduz os níveis de MPO no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	49
Figura 14	- Efeito do ALA nos níveis de IL-6 e de TNF- $\alpha$ no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	51
Figura 15	- ALA diminui a imunomarcagem de IL-1 $\beta$ no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	53
Figura 16	- ALA reduz o número de células imunopositivas para IL-1 $\beta$ no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano....	54

Figura 17	- ALA aumenta a imunomarcção de Ki67 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	56
Figura 18	- ALA aumenta o número de células imunopositivas para Ki67 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	57
Figura 19	- ALA reduz a diarreia em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	59
Figura 20	- ALA reverte o encurtamento do intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	61
Figura 21	- Efeito do ALA no centro geométrico da refeição teste de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	63
Figura 22	- Efeito do ALA no conteúdo de vermelho de fenol no intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	64
Figura 23	- Efeito do ALA na atividade da acetilcolinesterase no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ALA	Ácido alfa-lipóico
ANOVA	Análise de variância
APC	7- etil - 10 - [5 - ácido aminopentanóico) - 1 – piperidino - carboxicamptotecina
ATC	acetiltiocolina
CE	carboxiesterase
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
DAB	Diaminobenzidina
DHLA	ácido dihidrolipóico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
<i>et al</i>	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
H&E	Hematoxilina e eosina
GSH	Glutathiona reduzida
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-18	Interleucina-18
IL-33	Interleucina-33
i.p.	Intraperitoneal
KCl	Intraperitoneal
LEICA	Sistema de aquisição de imagens
MDR1	Multidrug Resistance Protein1
MPO	Mieloperoxidase
MRP2	Multidrug Resistance-associated Protein 2
MTX	Metotrexato

Myd88	Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
NFκB	Fator de transcrição nuclear-Kb
NO	Óxido Nítrico
NPC	7- etil - 10 - [4 - amino1 - piperidino] - carboxicamptotecina
RNAm	Ácido Ribonucleico mensageiro
SF	Soro Fisiológico
TLR	Receptor do tipo Toll-like
TNBS	Ácido trinitrobenzeno sulfônico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral -α
(UDP-GT)	urinina difosfato glicuronosil-transferase

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\kappa$	Kappa
®	Marca registrada
+	Mais
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
&	E

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1	Irinotecano.....	17
1.2	Patogênese da mucosite intestinal associada ao irinotecano.....	20
1.3	Patogênese da diarreia associada ao irinotecano.....	23
1.4	Ácido alfa lipóico (ALA).....	24
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>28</b>
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1	Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo.....	29
4.2	Aspectos éticos.....	29
4.3	Animais.....	29
4.4	Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	29
4.5	Grupos experimentais.....	30
4.6	Parâmetros avaliados.....	31
4.6.1	Análise ponderal.....	31
4.6.2	Análise da sobrevida.....	31
4.6.3	Análise morfométrica e histopatológica.....	31
4.6.4	Imunohistoquímica.....	32
4.6.5	Dosagem de MPO.....	33
4.6.6	Determinação de Glutathiona reduzida (GSH).....	34
4.6.7	Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-6).....	34
4.6.8	Avaliação do escore de diarreia.....	35
4.6.9	Trânsito intestinal e medida do comprimento do intestino delgado.....	36
4.6.10	Avaliação da atividade da acetilcolinesterase.....	36
4.7	Análise estatística.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
5.1	Efeito do ALA na perda ponderal induzida por irinotecano.....	38
5.2	Efeito do ALA na sobrevida de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	40

5.3	Efeito do ALA nas alterações histológicas induzidas por irinotecano.....	42
5.4	Efeito do ALA nos níveis teciduais de GSH no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	46
5.5	Efeito do ALA nos níveis teciduais de MPO no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	48
5.6	Efeito do ALA nos níveis teciduais de IL-6 e de TNF- $\alpha$ no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	50
5.7	Efeito do ALA na imunomarcção de IL-1 $\beta$ no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	52
5.8	Efeito do ALA na imunomarcção de Ki67 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	55
5.9	Efeito do ALA no escore de diarreia de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	58
5.10	Efeito do ALA no comprimento do intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	60
5.11	Efeito do ALA no trânsito intestinal de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	62
5.12	Efeito do ALA na atividade da acetilcolinesterase em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.....	65
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Irinotecano

O irinotecano é um derivado semi-sintético de camptotecina. Esse quimioterápico foi inicialmente isolado nos Estados Unidos da América (EUA) por Wall *et al.* (1966) a partir de uma planta nativa da China, a *Camptotheca acuminata* (Figura 1). Sendo aprovado para o tratamento de câncer colorretal metastático, cujo tratamento primário era realizado com fluorouracil, na França e no Japão e pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA em 1995 e 1996 respectivamente (RATAIN, 2002).

Figura 1 – *Camptotheca acuminata*



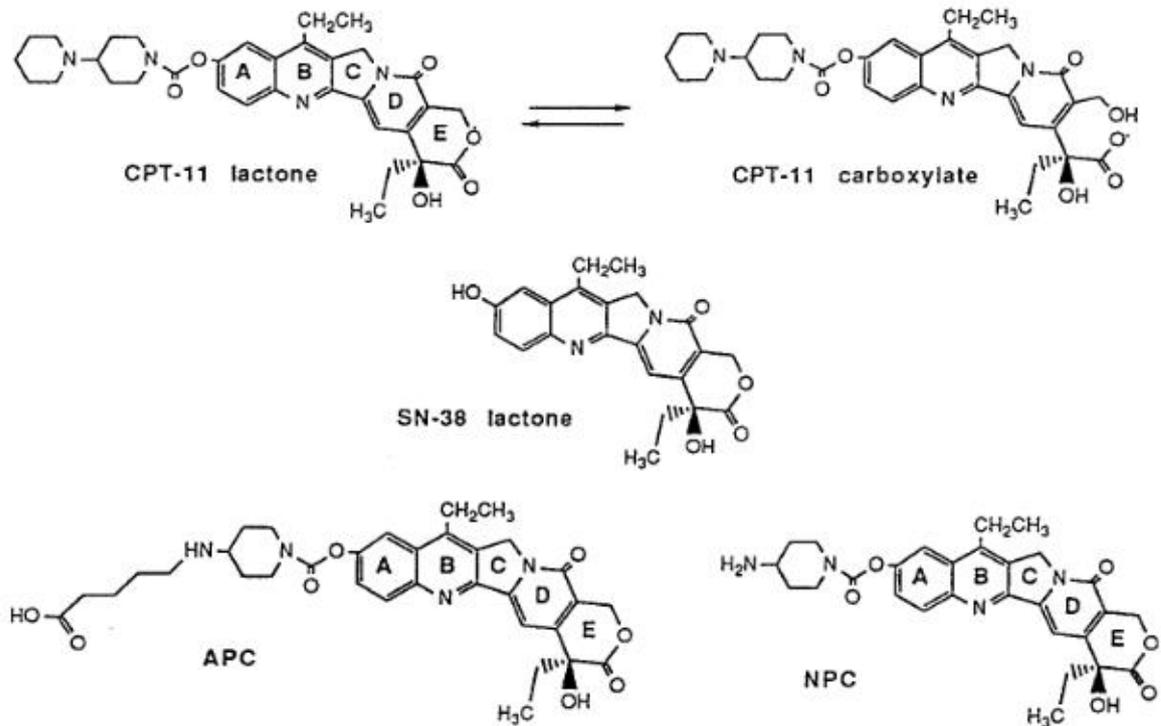
Fonte: <https://portuguese.alibaba.com/product-detail-img/irinotecano-e-topotecano-agentes-antineopl-sicos-100386226.html>. A figura demonstra a *Camptotheca acuminata* que é uma planta nativa da China.

A descoberta proporcionou o desenvolvimento da primeira geração de fármacos análogos da camptotecina, como irinotecano (Camptosar®) e o topotecano (Hycantina®), ambos solúveis em água, preparados na forma de sais, preservando-se a subunidade farmacológica iridoídica, representada pelo anel lactônico hidroxilado. Atualmente, esses dois análogos de primeira geração de camptotecina são usados para tratar cânceres ovarianos, colorretais e de pulmão. (OBERLIES; KROLL, 2004).

O irinotecano é um sal triidratado, 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carboniloxi-camptotecina (Figura 2), que possui um anel ( $\alpha$ -hidroxi-3-lactona) que sofre

hidrólise reversível no lúmen intestinal produzindo carboxilato e lactona (CHESTER *et al.*, 2003; DODDS *et al.*, 1998).

Figura 2 – Estrutura do irinotecano.

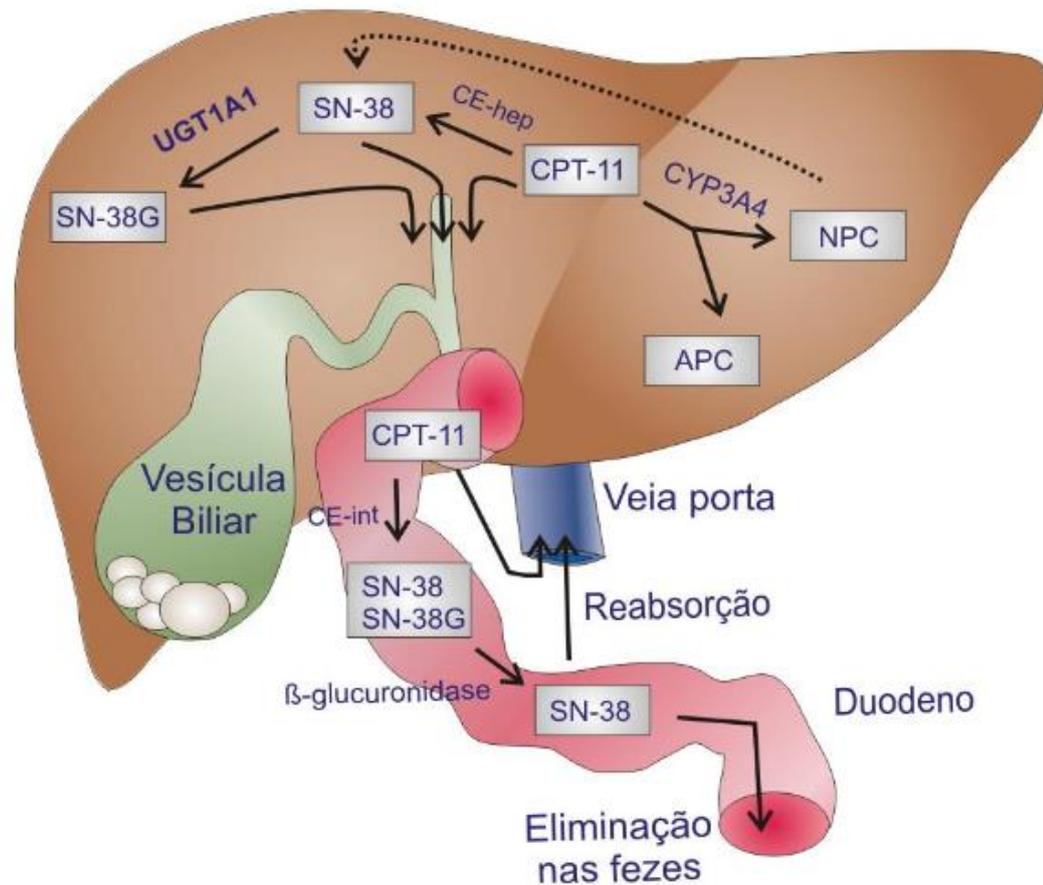


Fonte: Dodds *et al.* (1998). A figura demonstra as estruturas de lactona de irinotecano, carboxilato de irinotecano, lactona de SN-38, APC (7- etil - 10 - [5 - ácido aminopentanóico] - 1 - piperidino] - carboxicamptotecina) e NPC (7- etil - 10 - [4 - amino1 - piperidino] - carboxicamptotecina).

Irinotecano é uma pró-droga que é convertida em seu metabólito ativo, SN-38, pela enzima carboxiesterase (CE). Esse metabólito ativo é considerado 1000 vezes mais potente (KAWATO *et al.*, 1991; HUMERICKHOUSE *et al.*, 2000).

Em relação ao metabolismo desse fármaco, ocorre principalmente no fígado, por uma enzima do sistema CYP450, particularmente a CYP3A4, que gera componentes inativos como APC (7- etil - 10 - [5 - ácido aminopentanóico] - 1 - piperidino] - carboxicamptotecina) e NPC (7- etil - 10 - [4 - amino1 - piperidino] - carboxicamptotecina) (MATHIJSEN *et al.*, 2004). Uma parte do APC pode ser metabolizada pela CE em SN-38. Já o NPC é metabolizado completamente em SN-38 por essa enzima, contribuindo na atividade e toxicidade do irinotecano *in vivo* (DODDS *et al.*, 1998). Após o 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), um composto inativo, conforme ilustrado na figura 3 (CHESTER *et al.*, 2003).

Figura 3 – Metabolismo do Irinotecano



Fonte: Wong (2013), Takasuna *et al.* (1996), Chester *et al.* (2003) e Tallman, Ritter e Smith (2005). No fígado, o irinotecano é convertido em APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). Esta reação é catalisada pela enzima CYP3A4. O NPC pode ser metabolizado em SN-38 pela carboxiesterase (CE). A depuração do SN-38 é feita no fígado pelo polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1), gerando glicuronídeos de SN-38 (SN-38G), que não apresentam atividade biológica. Irinotecano, SN-38 e SN-38G são excretados na bile por meio das proteínas de transporte MDR1 (multidrug resistance protein1) e MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) e chegam ao intestino delgado por meio da papila de Vater. No intestino delgado, o irinotecano pode ser convertido em SN-38 por meio das CE intestinal. Além disso, o SN-38G pode ser desconjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de β-glucuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido por meio da circulação entero-hepática.

O Irinotecano e seu metabólito ativo (SN-38) são inibidores seletivos da topoisomerase I. A citotoxicidade do irinotecano deve-se ao dano ao DNA durante a fase S do ciclo celular quando as enzimas de replicação colidem com um complexo ternário do fármaco, com o DNA e com a topoisomerase I. Este dano induzido pelo quimioterápico não é corrigido de forma eficaz, ocasionando apoptose (ALIMONT *et al.*, 2004; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001).

A topoisomerase I é uma enzima que atua sobre a dupla fita do DNA relaxando a supertorção gerada durante a fase de transcrição e replicação do DNA (WANG; SINHA

1996). Devido ao tamanho do cromossomo eucariótico, a remoção da supertorção se faz necessária e é realizada por meio da introdução de quebras transitórias em uma das cadeias de dupla fita do DNA, o que permite que a cadeia que foi quebrada gire em torno da fita complementar intacta e a supertorção conseqüentemente seja removida. Após o relaxamento, a ligação intermediária covalente entre a topoisomerase I e o DNA se desfaz, sendo a fita de DNA religada normalmente, permitindo a continuação da replicação (CHAMPOUX, 2001).

A citotoxicidade induzida pelo SN-38 é influenciada pelas CEs intestinais,  $\beta$ -glucuronidase bacteriana e circulação entero-hepática que contribuem para o aumento e pela concentração do metabólito citotóxico SN-38 no intestino (HUMERICKHOUSE *et al.*, 2000)

O irinotecano age em células que apresentam intensa atividade mitótica, isto é, que exibem intensa atividade proliferativa, como as células cancerígenas. Essa característica não se restringe a essas células, uma vez que células-tronco intestinais também a exibem. Devido à inespecificidade do irinotecano, este fármaco está associado a diversos efeitos colaterais como diarreia leve a grave, mucosite, neutropenia, náuseas e vômitos, hiperbilirrubinemia, tromboembolismo. Frequentemente resulta em redução da dose ou interrupção do tratamento (GLIMELIUS, 2005).

Sabe-se que dentre os efeitos colaterais mais freqüentes do irinotecano destaca-se a mucosite intestinal (IKUNO *et al.*, 1995).

## **1.2 Patogênese da mucosite intestinal associada ao irinotecano.**

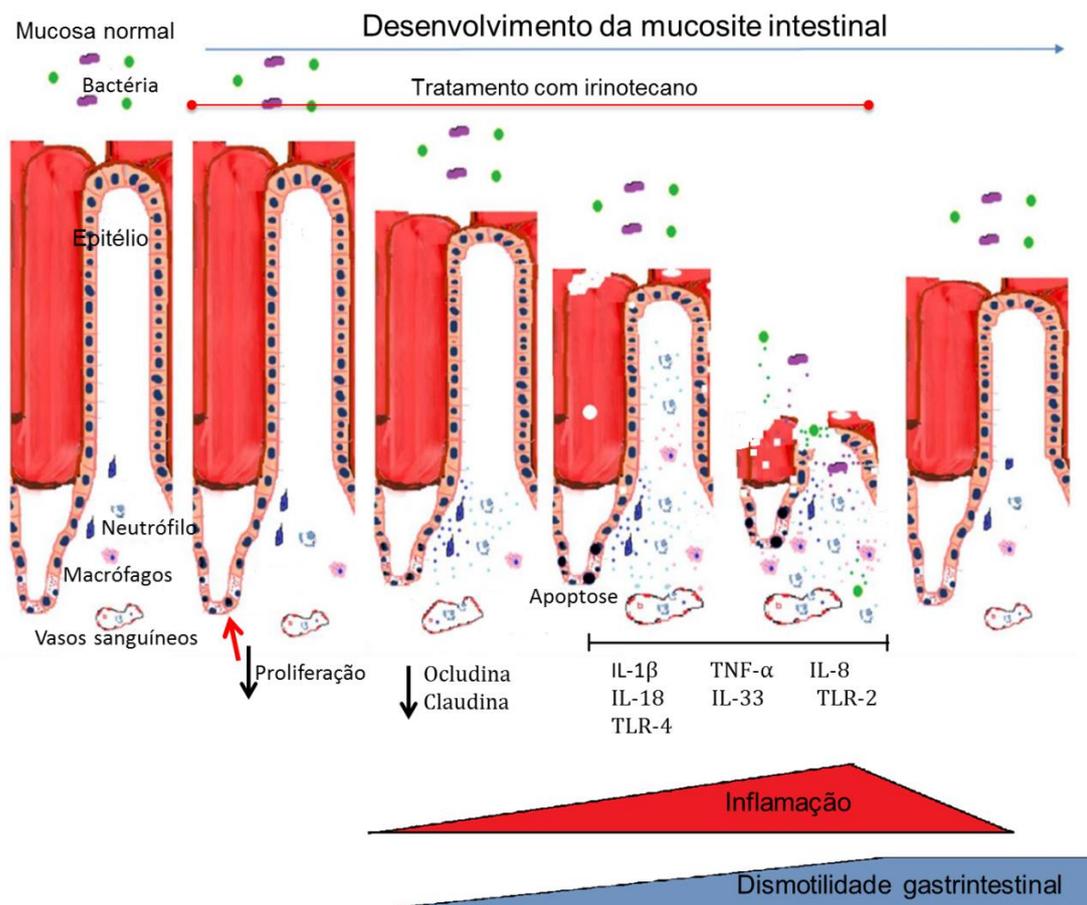
Mucosite é o termo clínico utilizado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia ou radioterapia sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral –mucosite oral – ou mucosa intestinal – mucosite gastrintestinal). A alta prevalência de manifestações clínicas adversas como disfagia, dispepsia, diarreia, náuseas e vômitos, dor abdominal, úlceras orais e anorretais, entre outras, são resultados da pouca seletividade dos agentes antineoplásicos e da alta taxa de proliferação do epitélio do trato gastrintestinal (GIBSON; KEEFE, 2006). Qualquer região da mucosa digestiva (desde a boca ao ânus) pode ser afetada (SONIS, 2004; SCULLY; SONIS; DIZ, 2006).

A mucosite oral e gastrintestinal pode afetar até 100% dos pacientes submetidos à quimioterapia de alta dose e transplante de células-tronco hematopoiéticas, 80% dos pacientes com neoplasias da cabeça e pescoço recebendo radioterapia e uma ampla gama de pacientes que recebem quimioterapia. Cerca de 15-40% dos pacientes submetidos a quimioterapia de

dose padrão em ensaios clínicos apresentam mucosite oral e intestinal, o que pode comprometer a qualidade de vida do doente e a eficácia dos regimes de quimioterapia (KEEFE *et al*, 2007; RUBENSTEIN *et al*, 2004).

Mucosite se desenvolve como consequência de lesão epitelial (Figura 4). No entanto, sua fisiopatologia é complexa e envolve vários mediadores incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio, em conjunto levando a danos epiteliais. Quimioterapia provoca diretamente danos no DNA e morte celular com a ativação de NFκB e suprarregulação da produção de citocinas. Na fase ulcerativa, erosão epitelial pode conduzir a um risco de translocação microbiana e choque séptico (VENTO; CAINELLI; 2003).

Figura 4 – Patogênese da lesão intestinal induzida por irinotecano.



Fonte: Adaptado de Costa (2016). O irinotecano por inibir a topoisomerase I, reduz a proliferação das células tronco intestinais, diminuindo a renovação das células da barreira epiteliais intestinal, com concomitante diminuição de ocludinas e claudinas, resultando no rompimento dessa barreira epitelial e invasão da mucosa intestinal por bactérias intestinais. Os fatores de virulência dessas bactérias estimulam receptores TLR-2 e 4 que desencadeiam resposta imune com intenso recrutamento de células inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios que intensificam ainda mais essa resposta. Com a cessação do quimioterápico, a inflamação diminui e o a lesão da parede intestinal é parcialmente revertida, porém os animais (em modelos experimentais) e pacientes prosseguem com dismotilidades intestinais.

Uma das características da lesão intestinal após administração do irinotecano é a presença de intenso infiltrado de células inflamatórias (como neutrófilos, macrófagos e mastócitos dentro da parede intestinal (GUABIRABA *et al.*, 2013; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2012, 2014; MELO *et al.*, 2008; NOGUEIRA, 2015). Além disso, vários mediadores inflamatórios já demonstraram ter importante função na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18, IL-33 e óxido nítrico (NO) (GUABIRABA *et al.*, 2013; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2012, 2014; MELO *et al.*, 2008).

Segundo Lima-Júnior *et al.* (2014), irinotecano induz a perda da arquitetura epitelial normal e o aumento do número de células apoptóticas nas criptas, em conjunto com a elevada expressão de RNAm de IL-18. Esse estudo mostrou que a inibição específica de IL-18 atenua a mucosite intestinal induzida por este quimioterápico em camundongos. Nesse mesmo estudo foi demonstrado que IL-18 também tem importante participação nas alterações da contratilidade intestinal induzida por irinotecano.

Há evidências de que as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , KC, IL-1 $\beta$ ) desempenham importante função da patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (MELO *et al.*, 2008). O papel dessas citocinas foi demonstrado por meio da sua inibição com pentoxifilina e talidomida. Estes, segundo evidenciado por esse estudo foi capaz de reverter parcialmente os efeitos do irinotecano na diarreia, nas alterações morfométricas e no aumento da concentração dessas citocinas pró-inflamatórias.

A citocina pró-inflamatória IL-33 demonstrou contribuir para a redução da sobrevida, inflamação e alterações da motilidade intestinal induzida por irinotecano, uma vez que a sua inibição preveniu essas alterações (GUABIRABA *et al.*, 2013). Da mesma forma, outro estudo encontrou achado semelhante na participação do óxido nítrico na patogênese da lesão intestinal e diarreia induzida por irinotecano (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2012).

Wong *et al.* (2015) demonstrou que a via TLR2,9/Myd88/NF $\kappa$ B é uma importante via na expressão de mediadores pró-inflamatórios na mucosite intestinal induzida por irinotecano. Nesse estudo, os autores demonstraram que a ausência de TLR2 ou Myd88 melhoraram consideravelmente as alterações histológicas e inflamatórias induzidas por irinotecano.

### 1.3 Patogênese da diarreia associada ao irinotecano.

O irinotecano é o único fármaco, entre as camptotecinas, capaz de causar diarreia, muitas vezes de maior gravidade e impacto clínico comparado a mielossupressão que se trata de outra toxicidade principal (ROTEMBERG, 1993).

O uso de protocolos quimioterápicos que incluem irinotecano pode causar diarreia em até 80% dos pacientes e em 47% deles, uma forma grave de diarreia. As consequências clínicas de diarreia induzida por quimioterapia incluem-redução da dose (45%), os atrasos no tratamento (71%) e descontinuação da terapia (ANDREYEV et al., 2014).

A lesão celular das células do trato gastrointestinal observada na mucosite por uso de irinotecano é resultado da hipoproliferação celular com encurtamento das vilosidades e aprofundamento das criptas que resulta em disfunção absorptiva e alteração na secreção de eletrólitos, principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , podendo acarretar diarreia (KEEFE, 2007). A presença de um epitélio intestinal funcionalmente e estruturalmente danificado favorece a translocação bacteriana, evento que parece desempenhar papel relevante na toxicidade intestinal e extra-intestinal da quimioterapia (GIBSON *et al.*, 2003).

Nakao *et al.* (2012), sugeriu que o CPT-11 lesiona as proteínas que compõe as junções firmes, incluindo claudina-1 e ocludina, alterando, deste modo, a barreira epitelial intestinal, um evento que pode potencialmente induzir a translocação bacteriana e diarreia. A perda de fluidos por meio das junções intercelulares parece ser agravada pelo aumento da contratilidade intestinal (WENZL, 2012).

O irinotecano está associado com dois tipos de diarreia. A diarreia início precoce (a partir de 24 horas), em seres humanos, com características leve, transitória e parte de uma síndrome colinérgica mais amplo que inclui sintomas como cólicas gastrointestinais, sudorese, salivação, distúrbios visuais, lacrimejamento, vermelhidão facial, náuseas, vômitos, miose e rinorreia (ROUGIER et al., 1997). Pode ser prevenida pela administração intravenosa de 0,25-1 mg de atropina (GANDIA et al., 1993). A pré-medicação com difenidramina, ondansetrona e escopolamina, também pode ser utilizado para diminuir a toxicidade (ZAMPA; MAGNOLFI; BORGOMASTRO, 2000).

A diarreia associada ao irinotecano pode ser dividida em duas fases: diarreia aguda ou precoce e diarreia crônica ou tardia. A aguda, de curso geralmente leve, ocorre durante ou logo após a administração do quimioterápico, pelo aumento da atividade colinérgica e inibição da acetilcolinesterase (AChE). A diarreia crônica possui alta incidência (em torno de 82%), pode limitar a eficácia do tratamento devido à necessidade de reduzir a

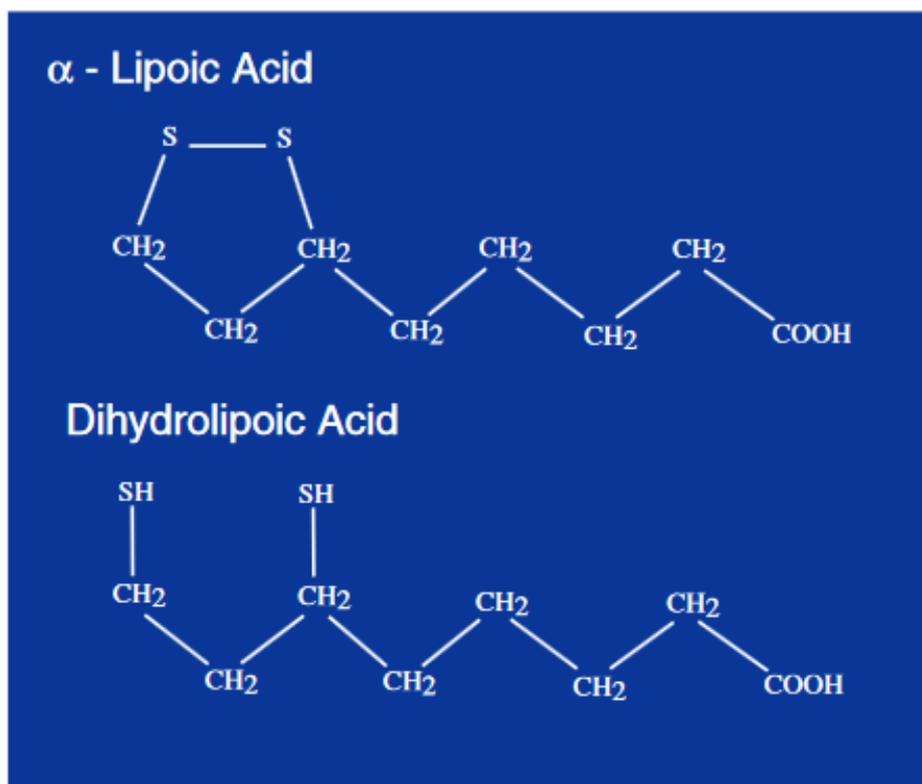
dose ou até mesmo suspender o tratamento (ALIMONTI *et al.*, 2004; DODDS *et al.*, 2001; DUNCAN; GANT, 2003; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004.) A diarreia tardia ocasionada pela administração de irinotecano, está relacionada a presença de SN-38 na mucosa intestinal (GRUPTA *et al.*, 1998).

Ao longo dos anos tem-se tentado buscar novas estratégias terapêuticas com o intuito de minimizar os efeitos da mucosite intestinal e da diarreia, buscando-se evidenciar o papel fisiológico de tais tratamentos em animais saudáveis. Assim, o papel do ácido alfa lipóico tem sido investigado em diversos estudos experimentais, mas ainda não foi evidenciada sua relação com o irinotecano.

#### 1.4 Ácido alfa lipóico (ALA)

O ácido alfa-lipóico (ALA), também conhecido como Ácido tióctico, é ácido graxo composto por 8 carbonos contendo um anel tiolano com uma ponte dissulfeto entre os carbonos 6 e 8 (figura 5). Foi descoberto em 1951 como uma molécula capaz de auxiliar na transferência de grupos acilo e como Coenzima no ciclo de Krebs. A partir da década de 80, ALA passou a ser considerado como um poderoso antioxidante (ALPHA-LIPOIC ACID, 2004).

Figura 5 – Estrutura química do ácido lipóico (A) e do ácido dihidrolipóico (B).



Fonte: Alpha-Lipoic Acid (2004).

Várias qualidades distinguem o ácido alfa-lipóico de outros antioxidantes: ALA pode ser sintetizado por animais e seres humanos; neutraliza os radicais livres nas regiões gordurosas e aquosas das células, em contraste a vitamina C (solúvel em água) e vitamina E (solúvel em gordura); e, ALA funciona como um antioxidante tanto na forma reduzidas, como na forma oxidada (PACKER; WITF; TRITSCHLER, 1995). Assim, ambas as formas protegem as membranas interagindo com ácido ascórbico e glutathione, ocasionando a reciclagem de vitamina E. Além disso, podem funcionar como Redox regulador de fatores de transcrição, fator de transcrição nuclear (NFκB) e ativador da proteína (SEN; PACKER, 1996).

Nutricionalmente, o ALA pode estar presente no germe de trigo, no levedo de cerveja e na carne vermelha. Contudo, a dieta dos mamíferos não provê quantidades suficientes de ALA para uma significativa ação antioxidante (MORIKAWA; YASUNO; WADA, 2001).

Ácidos octanóicos monossulfurados são substrato para a síntese *in vivo* do ALA. Sintetizado no organismo humano em quantidades muito pequenas, o ALA é covalentemente ligado à subunidade E2 de quatro diferentes complexos de  $\alpha$ -cetoácido desidrogenase na mitocôndria (LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006).

O lipoato é absorvido pela circulação do intestino e atravessa a barreira hematoencefálica, onde pode ser reduzido dentro das células cerebrais para ser exportado para o espaço intersticial como dihidrolipoato. Assim, os efeitos antioxidantes do ALA ou dos seus derivados ocorrem tanto na fase hidrofílica como na porção da membrana hidrofóbica (PACKER; TRITSCHLER; WESSEL, 1997).

Mais de 93% de uma dose de ALA, administrada por via oral, é absorvida pelo epitélio intestinal; contudo, apenas 20-30% não participa da metabolização hepática. Após a absorção, o ALA é reduzido intracelularmente a ácido dihidrolipóico (DHHLA) que pode subsequentemente sofrer S-metilação. ALA e DHHLA também estão sujeitos à  $\beta$ -oxidação. ALA é excretado pela urina na forma de metabólitos como o 4,6-bismetilmercapto-hexanóico que é o composto predominante. Em ratos, a excreção urinária é responsável por aproximadamente 80% da eliminação do ácido lipóico (CREMER *et al.*, 2006).

Trata-se de um antioxidante essencial que desempenha um papel crucial na via respiratória mitocondrial, incluindo desidrogenase. Atua com espécies reativas de oxigênio (ERO) tais como radicais hidroxilo, peróxido e superóxido e também protege a estrutura da membrana celular interagindo com glutathione (GSH), que é o substrato preferido de Vitamina E (PACKER; TRITSCHLER; WESSEL, 1997; PACKER, 1998). Assim, ALA pode ter um

importante valor terapêutico em patologias relacionadas à superprodução de radicais livres (PEREZ; CASTANEDA, 2006).

Estudos com ALA constataram a sua eficácia na prevenção de processos patológicos envolvendo ERO, como isquemia-reperfusão lesão, diabetes, hipertensão, lesão por radiação e ativação do vírus da imunodeficiência (SINGH; JIALAL, 2008; KOUFAKI, 2014).

O ALA também tem desempenhado um importante papel neuroprotetor promovendo a neuroproliferação após dano cerebral ocasionado por isquemia em ratos jovens (CHOI *et al.*, 2015). Tem sido estudado em modelo de esquizofrenia, onde possui efeito semelhante ao antipsicótico (VASCONCELOS *et al.*, 2015), como também a melhora da eficácia em modelos de depressão experimental quando associado ao antidepressivo (DE SOUSA *et al.*, 2015).

In vitro, ALA diminuiu a susceptibilidade plasmática à oxidação (MARANGON *et al.*, 1999), protegeu eritrócitos humanos contra hemólise induzida por radicais peróxil (CONSTANTINESCU; TRITSCHLER; PACKER, 1994), e aumentou a síntese de GSH em eritrócitos humanos isolados (HAN *et al.*, 1997).

Cremer *et al.* (2006) avaliaram a toxicidade e carcinogenicidade do ALA em ratos suplementados com doses de 20 a 180 mg/Kg/dia. O grupo que ingeriu ALA na dose de 180mg/Kg, não apresentou potencial carcinogênico ou toxicidade a algum dos órgãos avaliados, entre eles: coração, fígado, baço, rins, tireóide e cérebro.

Este composto também tem mostrado melhora no balanço glicolítico em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 além de ter efeitos antiobesidade (KONRAD *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2004). Recentemente, o interesse nas aplicações clínicas do ALA em muitas doenças crônicas tem sido extremamente elevado, talvez devido a sua segurança clínica relativa e às propriedades antioxidantes potentes (SMITH *et al.*, 2004).

No estudo sobre lesão renal induzida por metotrexato (MTX) em ratos, evidenciou-se que ALA contribuiu de forma significativa para a melhora da inflamação e do estresse oxidativo (ÇAKIR *et al.*, 2015).

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A mucosite intestinal é um dos efeitos colaterais mais prevalentes nos pacientes em uso de quimioterápicos, como o irinotecano. Caracteriza-se por intensa inflamação na mucosa intestinal que, geralmente, é acompanhada por diarreia.

Observa-se na literatura que alterações na motilidade intestinal associadas à inflamação podem ocorrer por distúrbios da liberação de neurotransmissores do plexo mioentérico e por hipertrofia e hiperplasia muscular (MOREELS *et al.*, 2001). A diarreia tardia ocasionada pelo irinotecano é um dos grandes problemas enfrentados pelos pacientes que é atenuada pela administração de loperamida, um antagonista do receptor opióide. Apesar de a loperamida ter importante efeito anti-diarreico, ela não tem efeito antiinflamatório (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Vale destacar que o surgimento da mucosite intestinal e diarreia durante o ciclo de quimioterapia requer redução da dose dos antineoplásicos, mudanças no esquema nutricional e adição de terapia antimicrobiana para os pacientes que desenvolvem infecção. De fato, todos esses fatores afetam a resposta do paciente ao tratamento (BOWEN; GIBSON; KEEFE, 2011).

Um dos grandes desafios no manejo da mucosite intestinal e diarreia induzidas pelo irinotecano é a descoberta de substâncias biologicamente ativas que sejam capazes de atenuar esses dois efeitos colaterais. No entanto, a maioria dos fármacos investigados na pesquisa pré-clínica falhou em atenuar a diarreia e inflamação intestinal de forma concomitante.

Neste aspecto, o ALA vem sendo amplamente estudado. Na enterite experimental induzida pela radiação, ALA demonstrou a redução do dano tecidual, da morte celular, do estresse oxidativo e da inflamação (JEONG *et al.*, 2016). Na colite ulcerativa induzida por sulfato de dextrano sódico, ALA reduziu a inflamação, o estresse oxidativo, o dano ao DNA e a fibrose em camundongos. Assim como preveniu o aumento da permeabilidade intestinal induzida pela colite ulcerativa (TRIVEDI; JENA, 2013).

Diante do exposto, o ALA pode também ser promissor na redução dos danos ocasionados pela mucosite intestinal associada ao uso do irinotecano.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do ALA na mucosite intestinal experimental por irinotecano

#### 3.2 Objetivos específicos

- Averiguar o efeito do ALA na perda ponderal induzida por irinotecano;
- Constar o efeito do ALA na sobrevivência de animais submetidos à mucosite intestinal por irinotecano.
- Avaliar o efeito do ALA nas alterações histológicas induzidas por irinotecano
- Verificar o efeito do ALA nos níveis de GSH na mucosite intestinal induzida por irinotecano;
- Averiguar o efeito do ALA na inflamação (avaliando os níveis MPO, IL-6 e de TNF- $\alpha$ , incluindo a expressão de IL-1 $\beta$ ) na mucosite intestinal induzida por irinotecano;
- Identificar o efeito do ALA na proliferação de células da cripta intestinal (avaliando a expressão de Ki67 por imunohistoquímica) na mucosite intestinal induzida por irinotecano;
- Investigar o efeito do ALA na diarreia, no comprimento do intestino delgado e no trânsito intestinal de animais submetidos à mucosite intestinal por irinotecano.
- Verificar o efeito do ALA na atividade da acetilcolinesterase em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo**

Os fármacos, os reagentes, os materiais e as soluções que foram utilizados neste estudo encontram-se detalhados no apêndice A.

### **4.2 Aspectos éticos**

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo de nº 31/2016), conforme apresentado no anexo A.

### **4.3 Animais**

No protocolo experimental foram utilizados camundongos Swiss, machos, com massa corpórea entre 25g a 30g, oriundos do Biotério central da Universidade Federal do Ceará- UFC.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, trocadas duas vezes por semana. Os animais permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos (temperatura:  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; com exaustão de ar e ciclo de 12h claro/12h escuro) e com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*.

### **4.4 Modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano**

O modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano foi realizado conforme descrito por Ikuno *et al.* (1995), sendo modificado conforme protocolo experimental. Irinotecano foi administrado por via intraperitoneal (75 mg/kg, uma vez ao dia) durante 4 dias. No 5º dia (após 24h da última dose) e no 7º dia (após 72h da última dose), os animais foram eutanasiados e segmentos intestinais (duodeno, jejuno e íleo) foram coletados para avaliar os parâmetros propostos por este estudo. Este período, de acordo com o modelo proposto, é capaz de mimetizar as alterações morfológicas e funcionais no intestino ocasionado pelo uso desse quimioterápico, incluindo aspectos clínicos como perda de peso, diarreia e redução da sobrevivência.

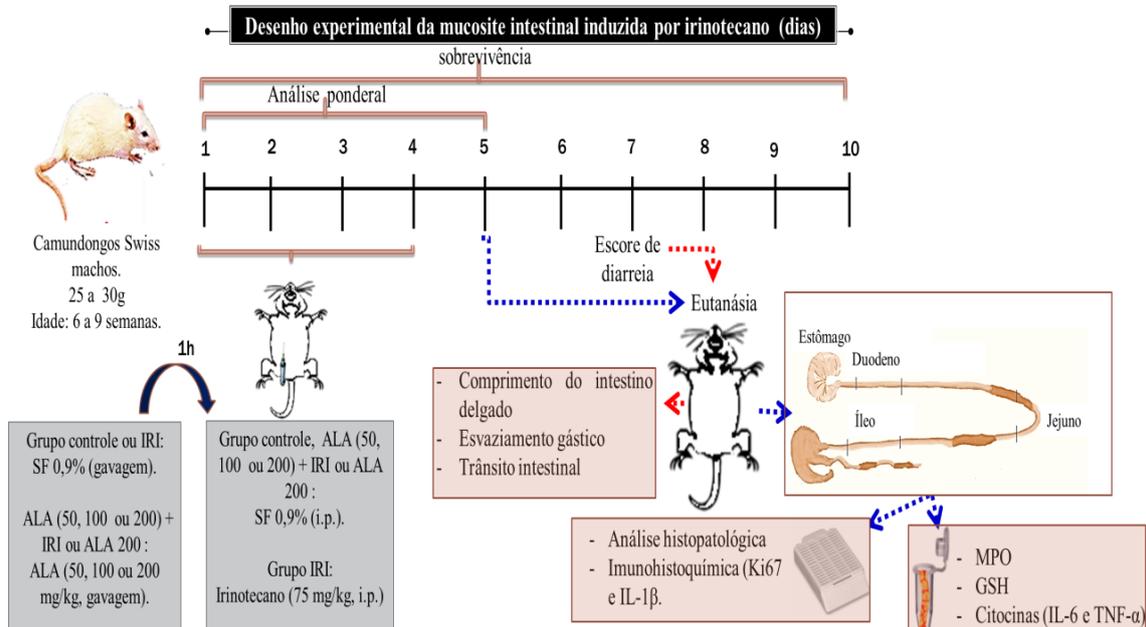
#### 4.5 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em seis grupos, sendo cada um composto por seis animais:

- **Grupo controle:** Os animais receberam soro fisiológico (SF) estéril 0,9% por via intraperitoneal e por gavagem durante quatro dias, iniciando-se no primeiro dia do protocolo experimental, sendo eutanasiados no quinto ou sétimo dia do protocolo experimental.
- **Grupo IRI:** Os animais receberam IRI (75mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal e SF 0,9% por gavagem (uma hora antes da administração do irinotecano) durante quatro dias, iniciando-se no primeiro dia do protocolo experimental, sendo eutanasiados no quinto ou sétimo dia do protocolo experimental.
- **Grupo ALA50+IRI:** Os animais receberam IRI (75mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal e ALA (50 mg/Kg de peso do animal) por gavagem (uma hora antes da administração do irinotecano) durante quatro dias, iniciando-se no primeiro dia do protocolo experimental, sendo eutanasiados no quinto dia do protocolo experimental.
- **Grupo ALA100+IRI:** Os animais receberam IRI (75mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal e ALA (100 mg/Kg de peso do animal) por gavagem (uma hora antes da administração do irinotecano) durante quatro dias, iniciando-se no primeiro dia do protocolo experimental, sendo eutanasiados no quinto dia do protocolo experimental.
- **Grupo ALA200+IRI:** Os animais receberam IRI (75mg/Kg de peso do animal) por via intraperitoneal e ALA (200 mg/Kg de peso do animal) por gavagem (uma hora antes da administração do irinotecano) durante quatro dias, iniciando-se no primeiro dia do protocolo experimental, sendo eutanasiados no quinto ou sétimo dia do protocolo experimental.
- **Grupo ALA200:** Os animais receberam ALA (200 mg/Kg de peso do animal) por gavagem e soro fisiológico (SF) estéril 0,9% por via intraperitoneal durante quatro dias, iniciando-se no primeiro dia do protocolo experimental, sendo eutanasiados no quinto dia do protocolo experimental.

As doses de ALA utilizadas nesse estudo foram estabelecidas conforme descrito por Vasconcelos *et al.* (2015) e modificadas de acordo com o modelo experimental do presente estudo. O protocolo experimental encontra-se ilustrado na figura 6.

Figura 6 – Esquema de indução da mucosite intestinal induzida por irinotecano e protocolo experimental.



Fonte: Elaborada pela autora. ALA: ácido  $\alpha$ -lipóico; GSH: glutathiona reduzida; IRI: irinotecano; i.p.: intraperitoneal; MPO: mieloperoxidase.

## 4.6 Parâmetros avaliados

### 4.6.1 Análise ponderal

Os animais foram pesados uma vez ao dia até o 5º dia do protocolo experimental. Os valores encontrados foram expressos em variável de peso, em relação ao peso inicial. Essa análise forneceu dados para confirmar o modelo experimental utilizado neste estudo, além de verificar o efeito do ALA nesta variável.

### 4.6.2 Análise da sobrevida

Os animais foram acompanhados diariamente até o 10º dia do protocolo experimental para a análise da sobrevida. A sobrevida foi expressa como taxa de sobrevivência (%).

### 4.6.3 Análise morfológica e histopatológica

Os segmentos obtidos do duodeno, jejuno e íleo foram fixados em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os segmentos intestinais foram retirados do formol e

inseridos em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Na etapa seguinte, os segmentos intestinais incluídos em parafina foram cortados em micrótomo para obter cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  de espessura, as lâminas contendo os cortes dos segmentos intestinais foram adequadamente processadas e coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

Posteriormente, com o auxílio de um microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagens (LEICA), foram medidas as alturas de 10 vilosidades e criptas intestinais do duodeno para mensurar o comprimento da altura das vilosidades, a profundidade das criptas intestinais e a razão vilosidade/cripta. A altura das vilosidades e das criptas duodenais foram obtidas em  $\mu\text{m}$ .

Em seguida, um histopatologista de forma randomizada avaliou a gravidade da mucosite intestinal induzida por irinotecano por meio do sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer (1978). Este sistema de escores avalia alterações na camada mucosa e muscular e seus escores variam de 0 a 3 (Quadro 1).

Quadro 1 – Sistema de escores de Macpherson e Pfeiffer.

Escore	Achados histológicos
0	Achados histológicos normais.
1	Vilosidades encurtadas, perda da arquitetura das criptas, moderado infiltrado de células inflamatórias, vacuolização celular e edema na camada mucosa e camada muscular normal.
2	Vilosidades encurtadas com células vacuolizadas, necrose das criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular normal.
3	Vilosidades encurtadas com células vacuolizadas, necrose de criptas, intenso infiltrado de células inflamatórias, vacuolização e edema na camada mucosa e camada muscular com edema, vacuolização e infiltrado de neutrófilos.

#### 4.6.4 Imunohistoquímica

Para avaliar a localização de marcadores de proliferação celular (Ki67) e de inflamação (IL-1 $\beta$ ) no duodeno foi realizado imunohistoquímica para esses imunomarcadores.

Primeiramente foram removidas as alças intestinais, onde as mesmas foram isoladas, separadas e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. Os tecidos foram processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos intestinais

foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4µm que foram inseridos em lâminas histológicas silanizadas.

Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes dos tecidos intestinais foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilol por cinco minutos cada. Em seguida, os cortes intestinais foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, por três minutos cada. Ao final dessa etapa, os cortes intestinais foram submersos a um banho de água destilada por 10 minutos e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 7,0) por 20 min em banho Maria (95°C). Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 minutos. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Sigma Aldrich) por 30 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários para anti-Ki67 (Abcam, 1:100) ou IL-1β (Santa cruz biotechnology, 1:200) por 1h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero (DAKO). Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante três minutos cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

As imagens da imunohistoquímica foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAS 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha). Obtiveram-se de 8 a 10 campos por corte intestinal. Para quantificar as células com imunomarcção positiva para Ki67 ou IL-1β, utilizou-se o programa ImageJ, onde foi reconhecida como imunomarcção positiva, células com citoplasma apresentando coloração marrom.

#### **4.6.5 Dosagem de MPO**

A Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o intestino.

Resumidamente, 50 a 100 mg dos segmentos do duodeno foram colocados num tampão fosfato de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados em macerador de tecidos (Politron®). A seguir, o homogenato foi centrifugado a 5000 rpm por 2 minutos, incubado por 20 min em -20°C e vortexado por 40s. Na etapa seguinte, 10µl do sobrenadante foi inserido em placa de 96 poços. Em seguida, adicionou-se 200 µl da solução de O-dianosidina (5 mg de O-dianosidina, 27 ml de água ultrapura, 3 ml de tampão fosfato e 15 µl de peróxido de hidrogênio a 30%) em cada poço. Imediatamente após inserir essa solução, realizou-se a leitura no espectro de 450 nm em leito de ELISA no tempo 0 e 1. Os níveis de MPO foram expressos como U MPO/ mg de tecido. A unidade da atividade de MPO é definida como aquela capaz de converter 1 mmol de peróxido de nitrogênio em água em 1 minuto.

#### **4.6.6 Determinação de Glutathiona reduzida (GSH)**

Os níveis de GSH no duodeno foram avaliados utilizando o ensaio para determinação de grupos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). As amostras obtidas dos segmentos intestinais (100mg/ml) foram homogeneizadas em 0,02 M EDTA. Aliquotas de 100 µL do homogenato foram misturadas com 80 µL de H<sub>2</sub>O destilada e 20 µL de ácido tricloroacético a 50% para precipitação das proteínas. Depois dessa etapa, centrifugou-se essa mistura por 15 min em rotação de 3000 rpm à uma temperatura de 4°C. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram misturados com 200 µL de tampão TRIS (0.4 M, pH 8.9) e com 5 µL de 5,5-dithiobis-2-nitro-benzoic acid (DTNB, Sigma-Aldrich, EUA) e agitadas por 3 min. A absorbância foi então determinada a 412 nm contra um reagente branco (sem o homogenato). A concentração de GSH foi expressa em µg de GSH/mg de tecido a partir de uma curva padrão (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

#### **4.6.7 Dosagem de citocinas (TNF-α e IL-6)**

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF-α e IL-6 no intestino foram quantificados por ELISA. Os segmentos do duodeno foram coletados e homogeneizados em PBS 1% (contendo inibidor de protease, 1:100). A detecção das citocinas IL-6 e TNF-α foi realizada por meio do *Kit DuoSet* (R&D Systems, EUA). Resumidamente, as placas para ELISA de 96 poços foram incubadas com o anticorpo de captura para IL-6 ou TNF-α por 18h em temperatura ambiente com 100µL de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem (R&D Systems, EUA) e

bloqueadas com 200µL de BSA 1% (R&D Systems, EUA) por 1 h. Após o bloqueio, 100µL das amostras ou da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas três vezes com 200µl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-6 ou TNF- $\alpha$  em temperatura ambiente por 2 horas. Na etapa seguinte, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 200µL de tampão de lavagem e incubadas com 100 µL de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com 200µL de tampão de lavagem. Na etapa seguinte, 100 µL da solução substrato para revelação (R&D Systems, EUA) foram adicionados em cada poço e incubados por 20 min à temperatura ambiente, sendo protegidos da luz. A reação enzimática foi cessada, adicionando 50 µL solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Enfim, a absorbância foi medida à 450nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

#### 4.6.8 Avaliação do escore de diarreia

No 7º dia do protocolo experimental foi avaliado o grau de diarreia dos animais por meio do escore de diarreia descrito por Kurita et al. (2000). A região perianal dos animais foi observada quanto a presença de sujidade e a característica das fezes, quando presentes. De acordo com essas características, foi dado um dos seguintes escores: Escore 0= fezes de aspecto normal; escore 1= fezes levemente alteradas, um pouco umedecidas; escore 2= fezes úmidas com pouca sujidade perianal; escore 3= fezes úmidas com bastante sujidade perianal (Figura 7).

Figura 7 – Representação esquemática dos escores de diarreia descrito por Kurita *et al.* (2000).

<b>ESCORE</b>	<b>AVALIAÇÃO DA DIARREIA</b>
<b>Escore 0</b>	Fezes com aspecto normal
<b>Escore 1</b>	Fezes levemente alteradas, pouco umedecidas.
<b>Escore 2</b>	Fezes úmidas com pouca sujidade perianal
<b>Escore 3</b>	Fezes úmidas com bastante sujidade perianal.

#### 4.6.9 Trânsito intestinal e medida do comprimento do intestino delgado

No 7º dia do protocolo experimental foi avaliado o trânsito intestinal, conforme descrito anteriormente (LIU *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2008), e a medida do comprimento do intestino delgado

Primeiramente, os animais foram submetidos ao jejum por 18h. Decorrido este tempo, injetou-se 0,3 mL da refeição teste (0,75 mg de vermelho de fenol/mL de solução glicosada a 5%) por gavagem (via intragástrica). Após 20 min, os animais foram eutanasiados por decapitação e foi isolado o estômago do intestino delgado, ocluindo o esfíncter pilórico por meio de fio de algodão. Na etapa seguinte, mensurou-se o comprimento do intestino delgado por meio de uma régua de 60 cm. Após essa medida o intestino foi dividido em intestino proximal (40% do comprimento total do intestino delgado), intestino medial (30% do comprimento total do intestino delgado) e intestino distal (30% do comprimento total do intestino delgado). Em seguida, esses segmentos do trato gastrointestinal (estômago, intestino proximal, intestino medial e intestino distal) foram retirados, inseridos em tubos falcon de 15 mL (contendo 10 mL de NaOH 0,1M), homogeneizados mecanicamente (em nitrogênio líquido com auxílio de cadinho e pistilo) e centrifugados (2800 rpm, 10 min, 4°C). Após a centrifugação, 1mL de cada homogenato foi transferido para tubo de ensaio contendo 50 µL de TCA 20%. Esta mistura foi vortexada por 40s e centrifugadas (2800 rpm, 20 min, 4°C). Em seguida, adicionou-se 75 µL de cada sobrenante em placa de 96 poços e adicionou-se 100 µL de solução de NAOH 0,5M em cada poço. Por fim realizou-se a leitura da absorbância das amostras em 570 nm. A porcentagem de vermelho de fenol em cada segmento foi avaliada conforme descrito anteriormente (JUSTINO *et al.*, 2015).

#### 4.6.10 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase

A atividade da acetilcolinesterase (AChE) do intestino delgado (duodeno, jejuno ou íleo) e no cólon foi determinada de acordo com método proposto por Ellman *et al.* (1961). Este método tem como princípio a medida da velocidade de produção de tiocolina, à medida que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. Essa reação ocorre por meio da reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico, resultando num produto de cor amarelada.

Primeiramente, os segmentos do intestino delgado foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (na proporção de 10 mg de tecido para 100 µL de tampão fosfato de sódio, pH 7,0) e centrifugados (5000 rpm, 20 min, 4°C). Em seguida, adicionaram-se 500 µL

de tampão fosfato de sódio, 895  $\mu$ L de água destilada, 50  $\mu$ L de solução de DTNB (0,04g de DTNB e 0,015g de bicarbonato de sódio em 10 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0) e 5  $\mu$ L do homogenato em cubetas de vidro. Após a adição do homogenato, a absorbância foi zerada. Na etapa seguinte, inseriu-se 50  $\mu$ L de solução de iodeto de ATC (0,073g de ATC reconstituído em 5 mL de água destilada) em cada cubeta. Imediatamente, realizou-se a leitura no tempo 0 e 3 minutos da absorbância do produto dessa reação em 412 nm por meio de espectrofotômetro. A atividade enzimática é medida por meio da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. A atividade específica foi expressa em nanomoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto (nmoles/mg de proteína/min).

#### **4.7 Análise estatística**

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), exceto os escores histopatológicos que foram expressos pela mediana.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 5.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; para os escores histológicos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn; para a variável perda ponderal, realizou-se o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni; e para a variável sobrevivida, utilizou-se o teste o teste Mantel- Cox log rank.

O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

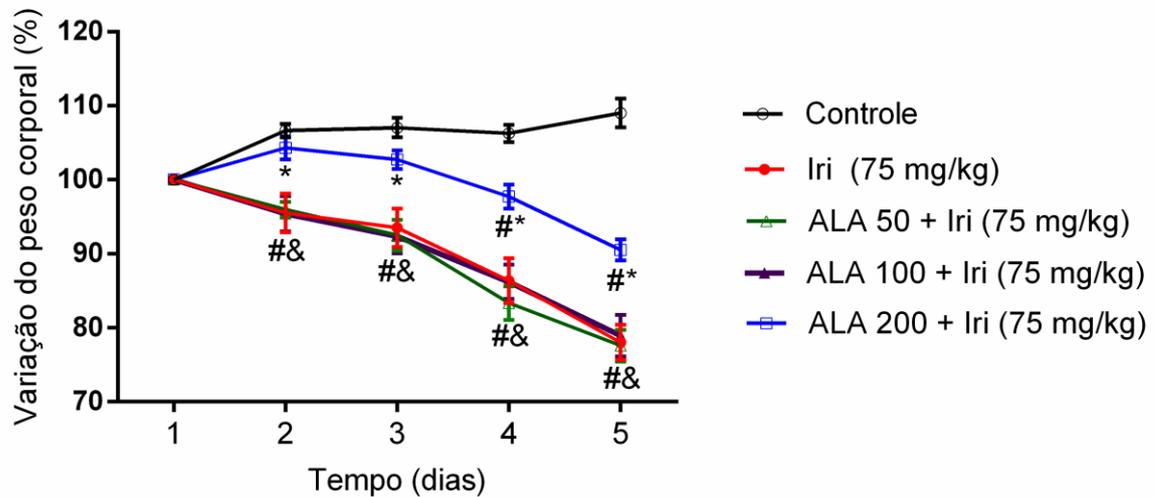
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito do ALA na perda ponderal induzida por irinotecano.

A perda ponderal é uma importante característica clínica de pacientes em uso de quimioterápicos, como irinotecano. Da mesma forma, camundongos submetidos ao modelo de mucosite intestinal experimental também a apresentam, sendo um importante marcador do estabelecimento e reprodutibilidade do modelo.

Conforme apresentado na figura 8, irinotecano ocasiona perda ponderal acentuada ( $p < 0,0001$ ) a partir do 2º dia do protocolo experimental, isto é, 24h depois da administração da primeira dose, que persiste de forma crescente até o 5º dia do protocolo experimental quando comparado ao grupo controle. Ao passo que ALA, apenas na dose de 200 mg/kg, reduziu parcialmente a perda ponderal de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Figura 8 – ALA reduz a perda de peso em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



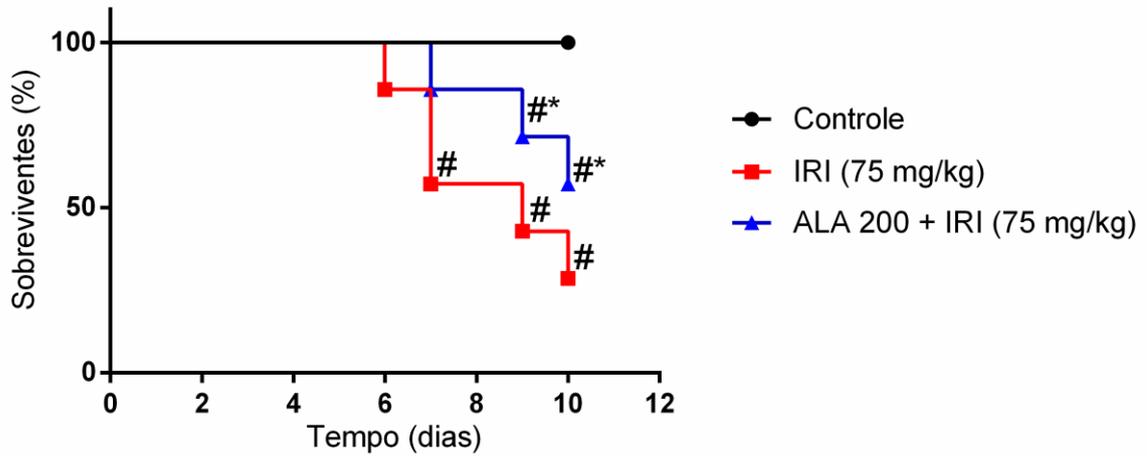
Camundongos Swiss (n=12) receberam salina (Grupo controle, 0,9%, i.p.) ou irinotecano (Grupo IRI, 75 mg/Kg, i.p. durante quatro dias). Uma hora antes da administração do quimioterápico, administrou-se ALA (Grupo ALA 50+irinotecano, 50 mg/Kg; Grupo ALA 100+irinotecano, 100 mg/Kg; Grupo ALA 200+irinotecano, 200 mg/Kg, v.o.) durante quatro dias e os animais foram eutanasiados no quinto dia do protocolo experimental. Os animais foram pesados diariamente até o quinto dia do protocolo experimental. A indução da mucosite intestinal por irinotecano induziu perda de peso em todos os grupos tratados com o quimioterápico quando comparado ao grupo controle. Enquanto que o tratamento desses animais com ALA na dose de 200 mg/Kg reduziu parcialmente essa perda de peso induzida por irinotecano. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM do percentual de variação do peso inicial. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,0001$  vs grupo controle, \*  $p < 0,0001$  vs grupo IRI e &  $p < 0,0001$  vs grupo ALA 200.

## **5.2 Efeito do ALA na sobrevida de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

A inserção do irinotecano no tratamento do câncer colorretal aumentou a sobrevida dos pacientes, porém ainda não chega a 50%. Esse achado também é reproduzido no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos.

Conforme apresentando na figura 9, o irinotecano ocasiona morte de camundongos a partir do 6º dia do protocolo experimental que ocorre de forma crescente até o 10º dia do protocolo experimental. A redução da sobrevida em camundongos pelo irinotecano se torna significativa ( $p < 0,05$ ) a partir do 7º dia do protocolo experimental em relação ao grupo controle, resultando em sobrevida de 25% no 10º do protocolo experimental. Ao passo que ALA (na dose de 200 mg/kg) aumentou ( $p < 0,05$ ) a sobrevida no 9º e 10º do protocolo experimental, em torno de 75% e 53% respectivamente, de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Figura 9 – Efeito do ALA na sobrevivência de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Os camundongos foram acompanhados até o 10º dia do protocolo experimental para avaliar a porcentagem de sobreviventes até esse período. Os pontos representam o percentual (%) de sobreviventes. Para análise estatística foi utilizado o teste Mantel- Cox log rank para curva de sobrevivência. Onde #  $p < 0,01$  vs grupo controle e \*  $p < 0,01$  vs grupo IRI.

### 5.3 Efeito do ALA nas alterações histológicas induzidas por irinotecano.

Conforme apresentado na tabela 1, irinotecano aumentou ( $p < 0,05$ ) o escore histológico em todos os segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) quando comparado ao grupo controle. Enquanto que o ALA (na dose de 100 ou 200 mg/kg) preveniu as alterações histológicas induzidas por irinotecano, reduzindo o escore histológico de forma significativa apenas no duodeno. A administração de apenas ALA (200 mg/kg) apresentou escores histológicos semelhantes ao grupo controle, demonstrando que a dose administrada não causa toxicidade nos animais.

De acordo com a figura 10, em condições normais (representado neste estudo pelo grupo controle) as vilosidades e criptas intestinais apresentaram-se íntegras e com poucas células inflamatórias (figura 10A). Enquanto que irinotecano promoveu desarranjo das criptas intestinais, encurtamento das vilosidades intestinais, vacuolização de células epiteliais e intenso infiltrado de células inflamatórias (figura 10B). Por outro lado, ALA 200 preveniu essas alterações histológicas induzidas por irinotecano no duodeno (figura 10C).

Ao mensurar o comprimento da altura das vilosidades intestinais, observou-se que irinotecano a reduz ( $p < 0,05$ ;  $148,7 \pm 5,53$ ) em torno de 66% quando comparado ao grupo controle ( $407,2 \pm 5,43$ ). Enquanto que ALA (na dose de 100-  $227,4 \pm 7,07$ - ou 200 mg/kg,  $253,1 \pm 8,54$ ), preveniu ( $p < 0,05$ ) os efeitos do irinotecano nas vilosidades do duodeno, apresentando uma redução apenas em 33% da altura das vilosidades intestinais em relação ao grupo controle (figura 11A).

De acordo com a figura 9B, irinotecano diminuiu ( $p < 0,05$ ,  $72,53 \pm 2,16$ ) a profundidade das criptas duodenais comparado ao grupo controle ( $120,7 \pm 2,08$ ). Enquanto que ALA (na dose de 100-  $108,2 \pm 2,62$ ) ou 200 mg/kg,  $92,5 \pm 2,85$ ), preveniu ( $p < 0,05$ ) os efeitos do irinotecano na profundidade das criptas intestinais (figura 11B).

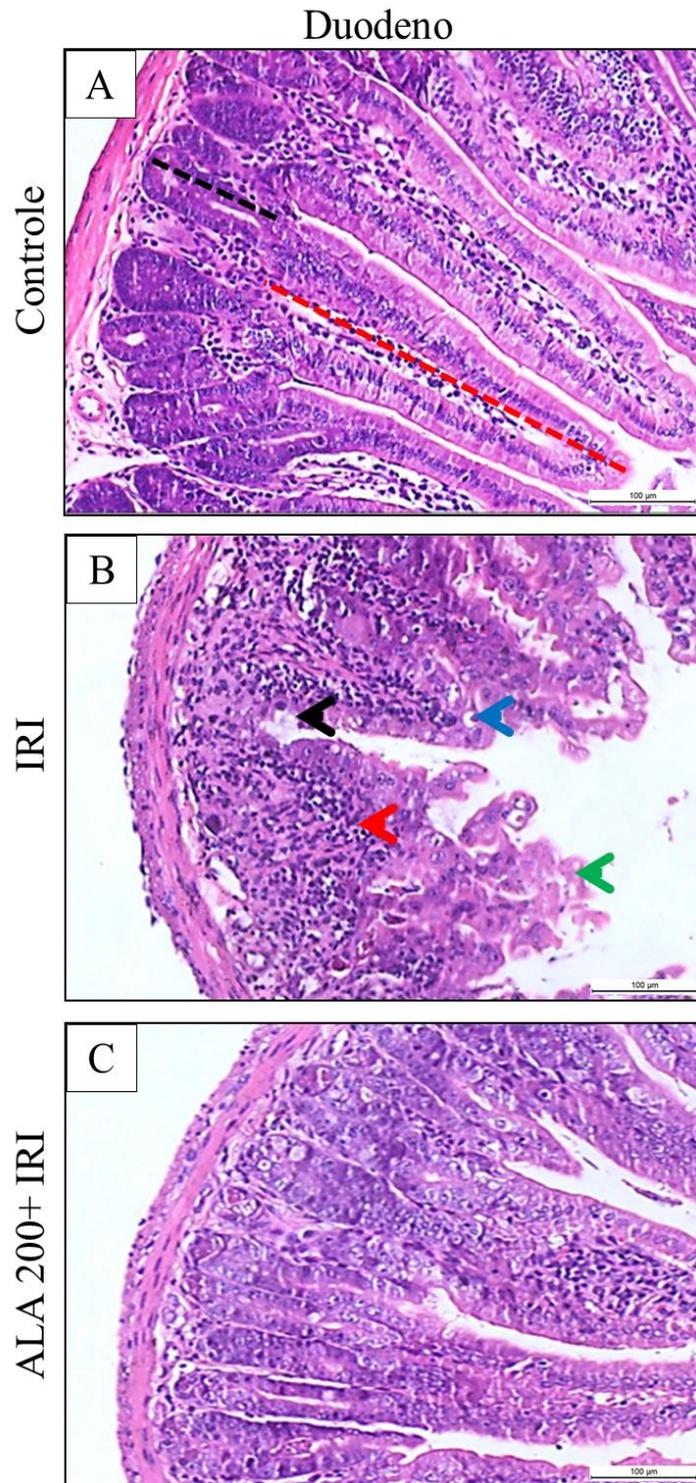
Ao mensurar a razão vilosidade/cripta do duodeno, observou-se que irinotecano a diminuiu ( $p < 0,05$ ,  $2,10 \pm 0,10$ ) comparado ao grupo controle ( $3,45 \pm 0,07$ ). Ao passo que ALA (apenas na dose de 200,  $2,87 \pm 0,13$ ) aumentou ( $p < 0,05$ ) a razão vilosidade/cripta comparado ao grupo irinotecano (figura 11C).

Tabela 1 – Efeito do ALA no escore histopatológico de segmentos intestinais de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Segmentos do intestino	Grupos experimentais					
	Controle	IRI	ALA 50+IRI	ALA 100+IRI	ALA 200+IRI	ALA 200
Duodeno	<u>0</u> (0-0)	<u>3</u> (3-3)#	<u>2</u> (2-3)#	<u>2</u> (1-3)*	<u>1</u> (0-2)*	<u>0</u> (0-0)
Jejuno	<u>0</u> (0-0)	<u>3</u> (3-3)#	<u>3</u> (3-3)#	<u>3</u> (1-3)#	<u>3</u> (2-3)#	<u>0</u> (0-0)
Íleo	<u>0</u> (0-0)	<u>3</u> (2-3)#	<u>2</u> (0-3)	<u>2</u> (1-3)#	<u>2</u> (0-3)#	<u>0</u> (0-0)

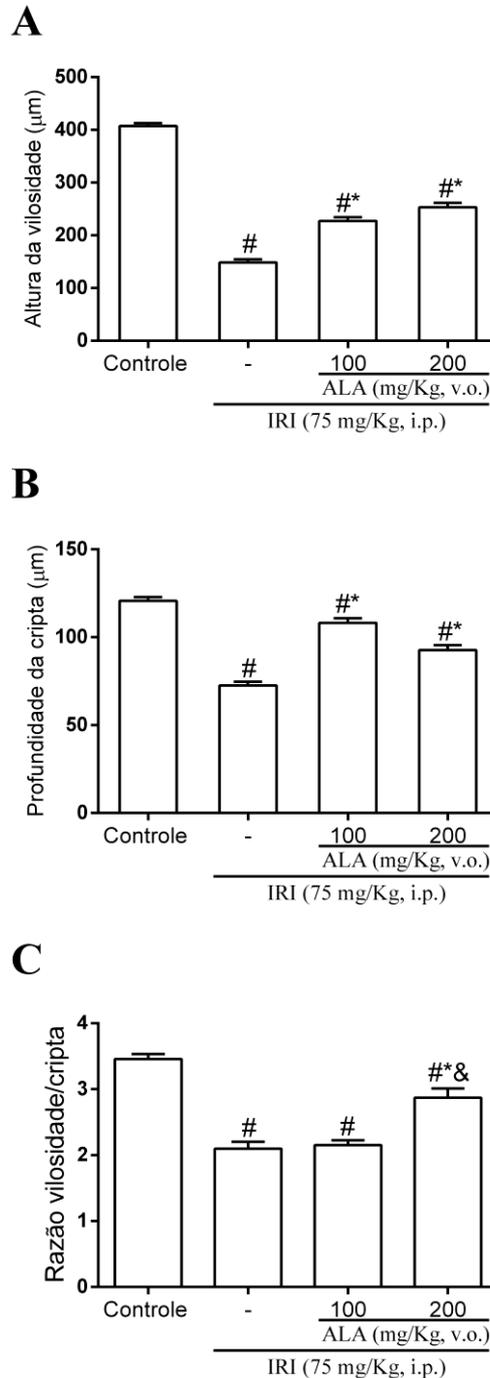
Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana, onde #  $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo IRI (n=6/grupo).

Figura 10 – Efeito do ALA nas alterações histológicas do intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Segmentos do duodeno foram removidos e corados pelo método de hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica. Os segmentos intestinais do grupo controle apresentam integridade das criptas (tracejado preto) e das vilosidades intestinais (tracejado vermelho), além da presença de escassas células inflamatórias na lâmina própria (painéis A). Irinotecano (painel B) ocasionou redução da altura das vilosidades (seta verde), desarranjo e lesão das criptas intestinais (seta preta), incluindo vacuolização de células epiteliais (seta azul) e formação de intenso infiltrado de células inflamatórias (seta vermelha). ALA (na dose de 200 mg/kg) preveniu essas alterações induzidas por irinotecano (painel C). Todos os painéis foram obtidos na escala de 100 μm.

Figura 11 – ALA aumenta o comprimento das vilosidades, a profundidade das criptas e a razão vilosidade/cripta do duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



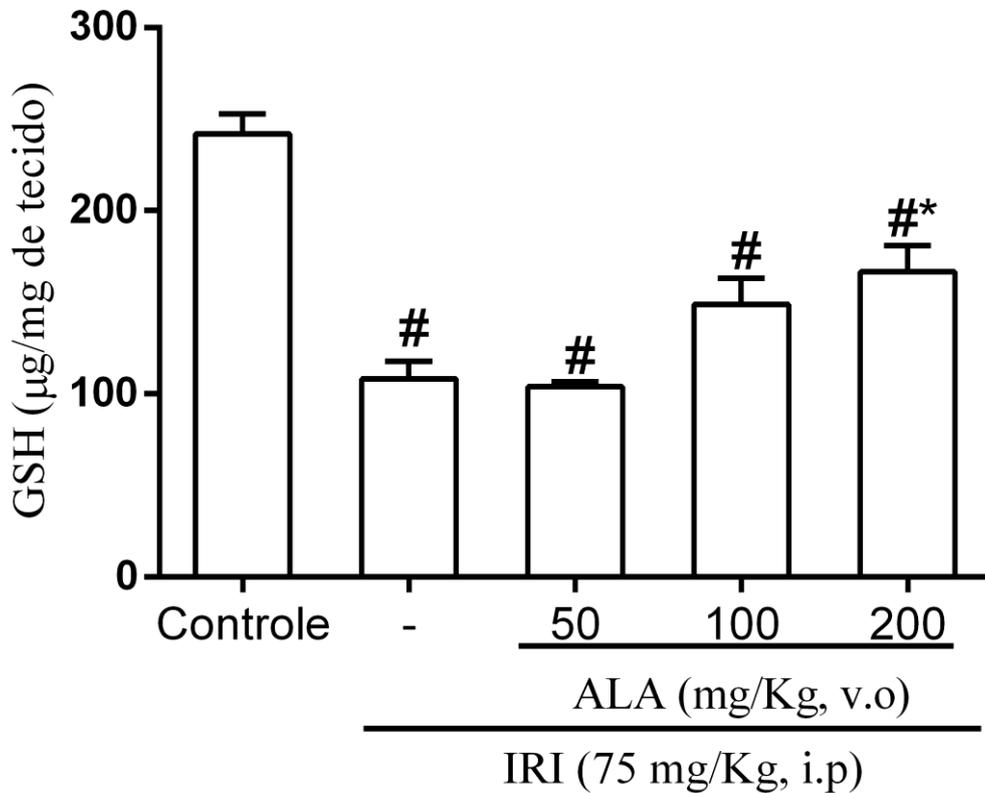
Segmentos do duodeno foram removidos e corados com H&E para mensurar o comprimento das vilosidades (A), a profundidade das criptas (B) e a razão vilosidade/cripta (C) do duodeno. Cerca de 10 vilosidades e 10 criptas foram analisadas de cada corte histológico. Os valores foram apresentados como média ± EPM da altura das vilosidades intestinais (µm), da profundidade das criptas intestinais (µm) ou da razão vilosidade/cripta. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo controle, \*  $p < 0,05$  vs grupo IRI e &  $p < 0,05$  vs grupo ALA100+IRI.

#### **5.4 Efeito do ALA nos níveis teciduais de GSH no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

A GSH é um antioxidante fisiológico presente no meio intracelular da maioria das células. A síntese desse antioxidante não ocorre de forma concomitante à sua utilização pela célula. Por conta disso, a avaliação dos seus níveis teciduais vem sendo amplamente utilizada como marcador de esse oxidativo.

De acordo com os dados apresentados na figura 12, irinotecano diminuiu ( $p < 0,05$ ,  $108,1 \pm 9,7$ ) os níveis de GSH no duodeno quando comparado ao grupo controle ( $241,9 \pm 11,0$ ). Enquanto que ALA (apenas na dose de 200 mg/kg,  $166,7 \pm 14,3$ ) aumentou ( $p < 0,05$ ) os níveis desse antioxidante fisiológico no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Figura 12 – ALA aumenta os níveis de GSH no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



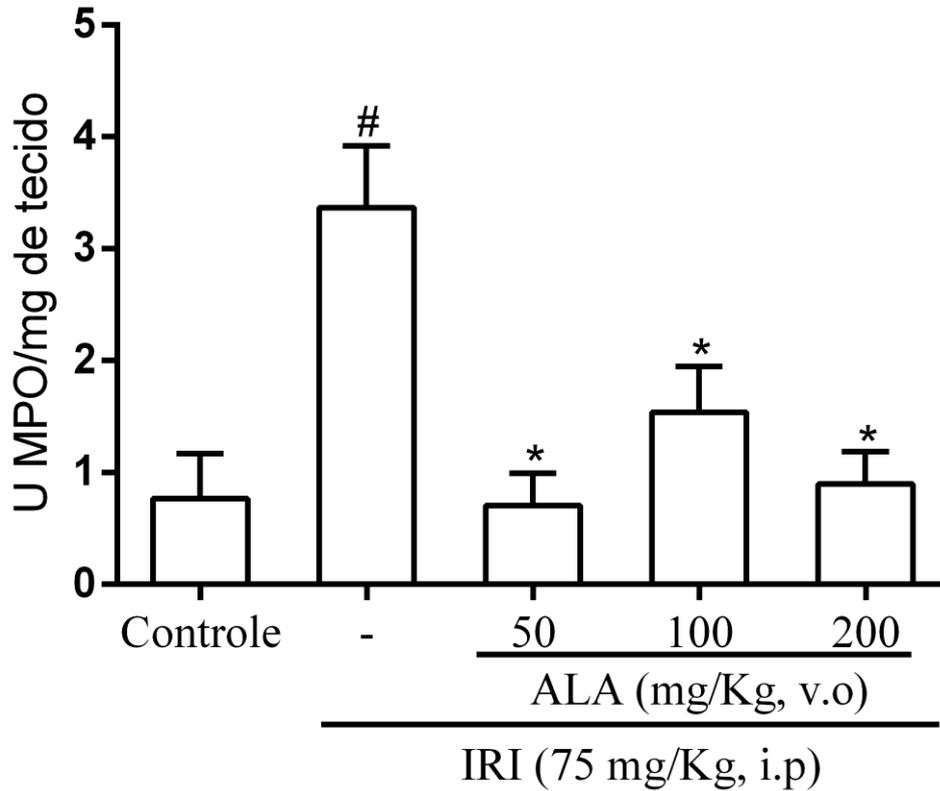
Segmentos do duodeno foram coletados para mensurar os níveis de GSH, antioxidante fisiológico. Observa-se que irinotecano diminui os níveis de GSH no duodeno quando comparado ao grupo controle. Enquanto que o ALA na dose de 200 mg/kg aumenta os níveis desse antioxidante fisiológico no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os valores foram apresentados como média ± EPM dos níveis de GSH expressos em µg/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo IRI.

### **5.5 Efeito do ALA nos níveis teciduais de MPO no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Devido a isso, ela é utilizada amplamente como um importante indicador de recrutamento de neutrófilos.

Conforme apresentado na figura 13, em condições normais (representada pelo grupo controle) há a presença de neutrófilos no duodeno, conforme detectado pelos níveis de MPO, porém em baixos níveis. Comparado ao grupo controle ( $0,76 \pm 0,39$ ), irinotecano elevou ( $p < 0,05$ ,  $3,36 \pm 0,55$ ) os níveis de MPO no duodeno. Enquanto que ALA (na dose de 100-  $1,53 \pm 0,4$ - ou 200,  $0,89 \pm 0,29$ ) diminuiu ( $p < 0,05$ ) os níveis dessa enzima no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Figura 13 – ALA reduz os níveis de MPO no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Segmentos do duodeno foram coletados para mensurar os níveis de MPO, enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Observa-se que irinotecano eleva os níveis de MPO no duodeno quando comparado ao grupo controle. Enquanto que o ALA reduz os níveis dessa enzima no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM dos níveis de MPO expressos em U MPO/mg de tecido. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo IRI.

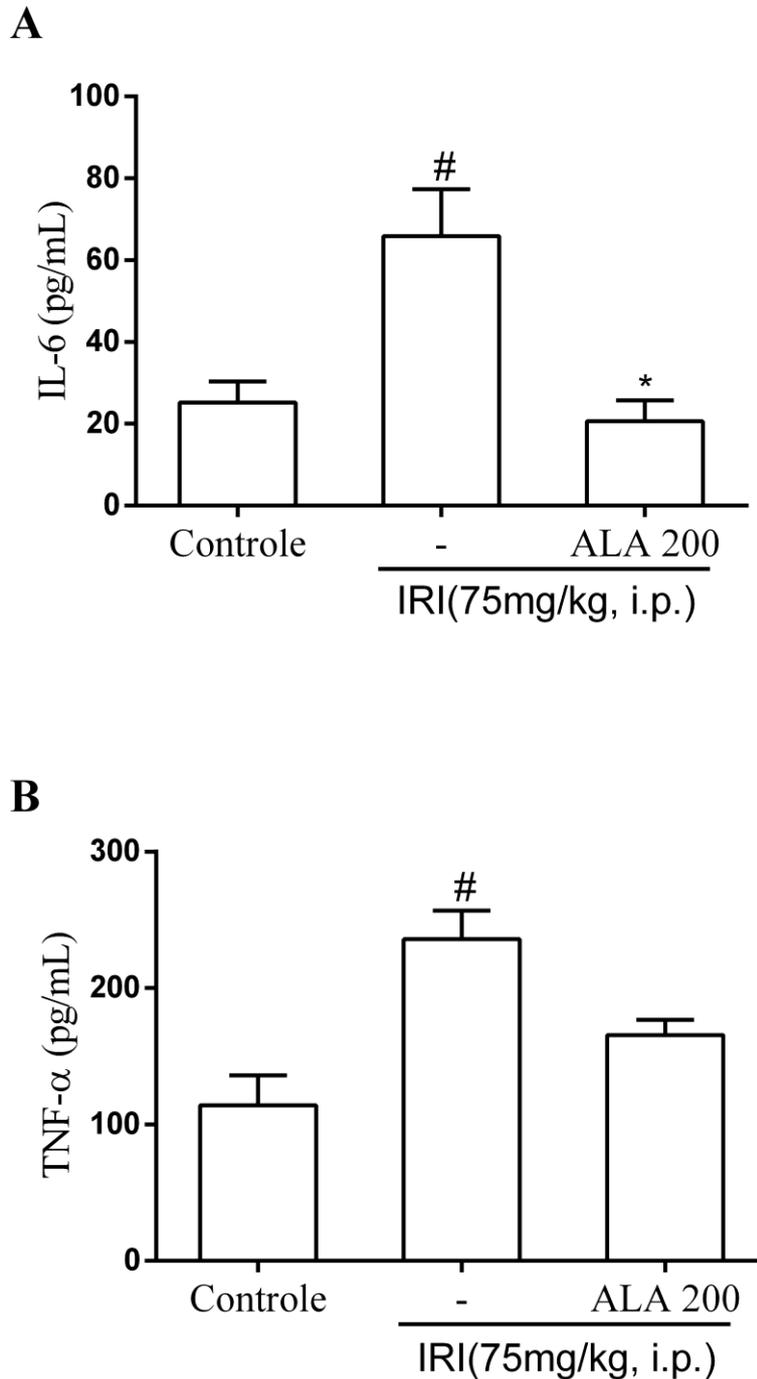
### **5.6 Efeito do ALA nos níveis teciduais de IL-6 e de TNF- $\alpha$ no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

A IL-6 e o TNF- $\alpha$  são citocinas pró-inflamatórias que podem ser sintetizadas por mastócitos, macrófagos, células gliais entéricas e neurônios.

De acordo com os dados apresentados na figura 14A, irinotecano aumentou ( $p < 0,05$ ,  $65,9 \pm 11,4$ ), cerca de 300%, os níveis de IL-6 em amostras duodenais quando comparado ao grupo controle ( $25,2 \pm 5,1$ ). Ao passo que ALA (na dose de 200 mg/kg,  $20,6 \pm 5,0$ ), reverteu os efeitos do irinotecano na síntese dessa citocina pró-inflamatória no duodeno.

Em relação aos níveis de TNF- $\alpha$ , irinotecano aumentou ( $p < 0,05$ ,  $235,8 \pm 21,0$ ) os níveis dessa citocina pró-inflamatória em amostras de duodeno quando comparado ao grupo controle ( $114 \pm 22,2$ ). No entanto, ALA (na dose de 200,  $165,5 \pm 11,3$ ) não reduziu a síntese dessa citocina no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (figura 14B).

Figura 14 – Efeito do ALA nos níveis de IL-6 e de TNF- $\alpha$  no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Segmentos do duodeno foram coletados para mensurar os níveis de IL-6 (A) e de TNF- $\alpha$  (B), uma citocina pró-inflamatória. Observa-se que irinotecano eleva os níveis de TNF- $\alpha$  (A) e de IL-6 (B) no duodeno quando comparado ao grupo controle. Enquanto que o ALA reverte os efeitos de irinotecano apenas nos níveis de IL-6 no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM dos níveis de IL-6 ou de TNF- $\alpha$  expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo IRI.

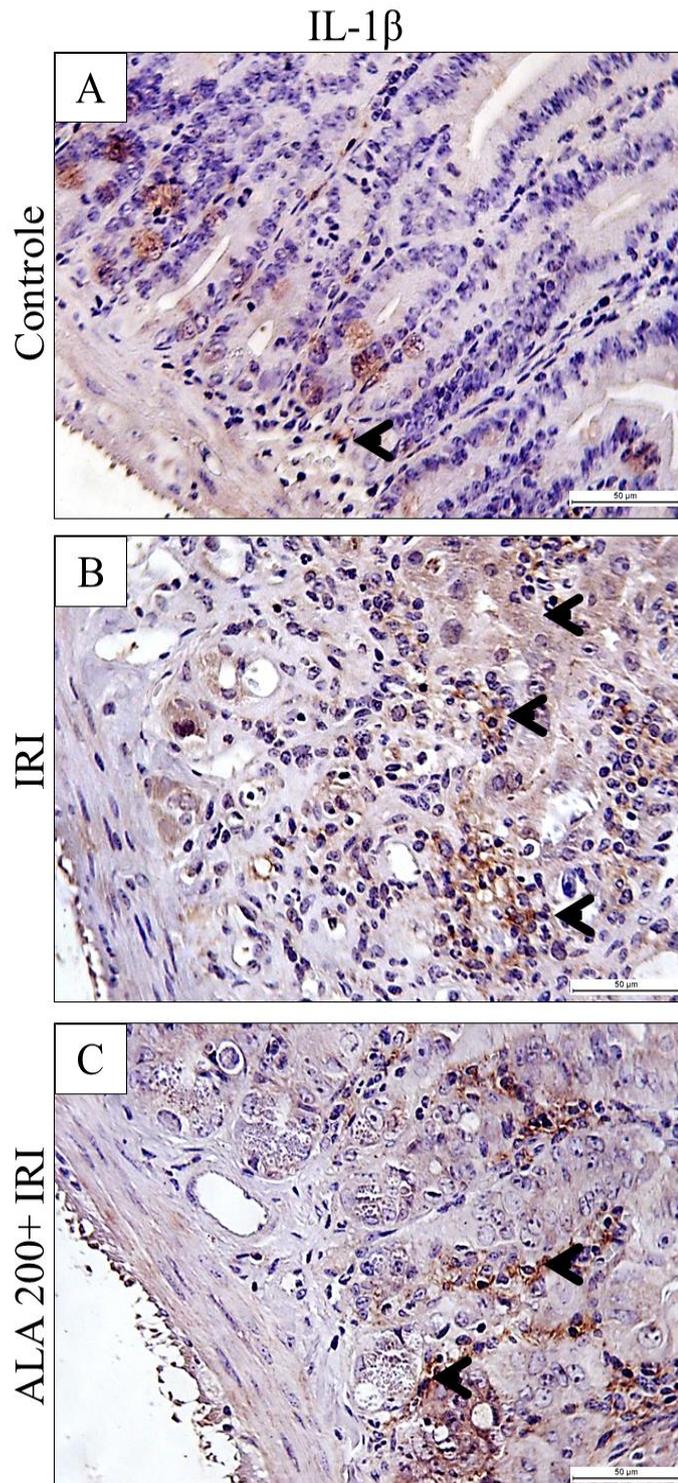
### **5.7 Efeito do ALA na imunomarcção de IL-1 $\beta$ no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória que pode ser sintetizada por células epiteliais, neutrófilos, macrófagos, células gliais e neurônios.

Conforme apresentado na figura 15, em condições normais (representado pelo grupo controle) há escassa imunomarcção de IL-1 $\beta$ , restringindo-se na sua maior parte células localizadas na cripta intestinal (figura 15A). Comparado ao grupo controle, irinotecano eleva a imunomarcção dessa citocina pró-inflamatória no duodeno (figura 15B). Observou-se células imunomarcadas no epitélio e na lâmina própria da mucosa duodenal e na submucosa (figura 15B). Enquanto que ALA (na dose de 200 mg/kg) diminuiu a imunomarcção de IL-1 $\beta$  principalmente no epitélio duodenal e na camada submucosa (figura 15C).

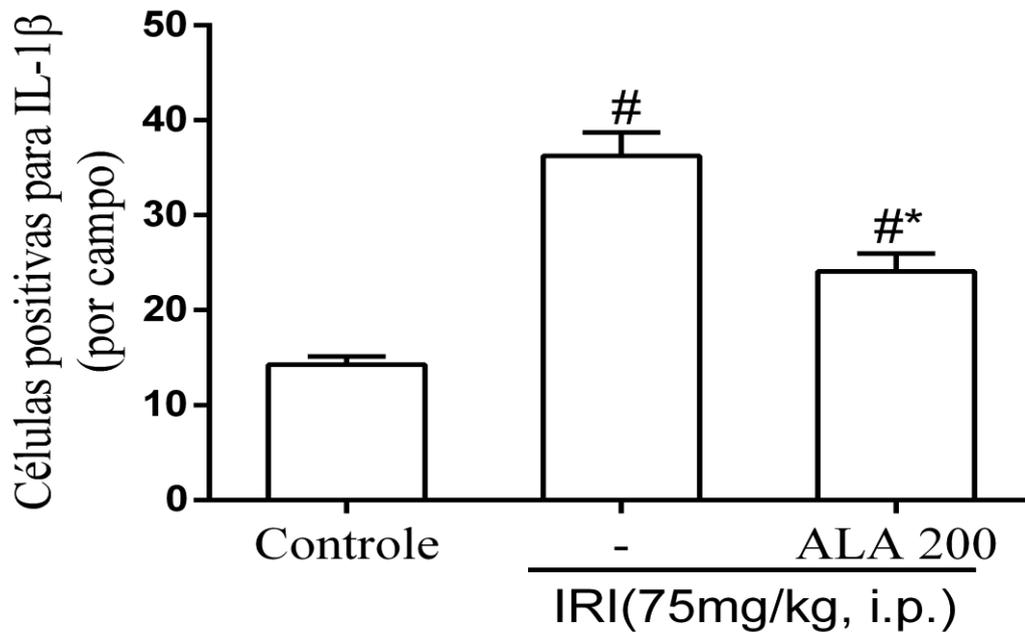
Ao realizar a contagem de células com imunomarcção positiva para IL-1 $\beta$ , observou-se que irinotecano elevou ( $p < 0,05$ ), em torno de 184%, o número de células imunopositivas para essa citocina pró-inflamatória quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, ALA (na dose de 200 mg/kg) diminuiu o número dessas células imunopositivas nas amostras duodenais de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (figura 16).

Figura 15 – ALA diminui a imunomarcção de IL-1 $\beta$  no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Segmentos do duodeno foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para IL-1 $\beta$ , que é uma citocina pró-inflamatória. Nota-se aumento da imunomarcção para IL-1 $\beta$  no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (painel B) quando comparado ao controle (painel A). Enquanto que ALA na dose de 200 diminui a imunomarcção dessa citocina pró-inflamatória em animais submetidos à mucosite intestinal por irinotecano (painel C) quando comparado ao grupo IRI. Todos os painéis foram obtidos na escala de 50  $\mu$ m.

Figura 16 – ALA reduz o número de células imunopositivas para IL-1 $\beta$  no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Segmentos do duodeno foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para IL-1 $\beta$ , que é uma citocina pró-inflamatória. Foram fotografados de 8 a 10 campos/corte histológico (escala de 50  $\mu$ m). As células imunopositivas para IL-1 $\beta$  foram quantificadas por meio do software ImageJ. Observa-se que irinotecano aumenta o número de células positivas para IL-1 $\beta$  no duodeno quando comparado ao grupo controle. Enquanto que ALA diminui essa imunomarcção no duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM do número de células positivas para IL-1 $\beta$  (por campo). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde # p < 0,05 vs grupo controle e \* p < 0,05 vs grupo IRI.

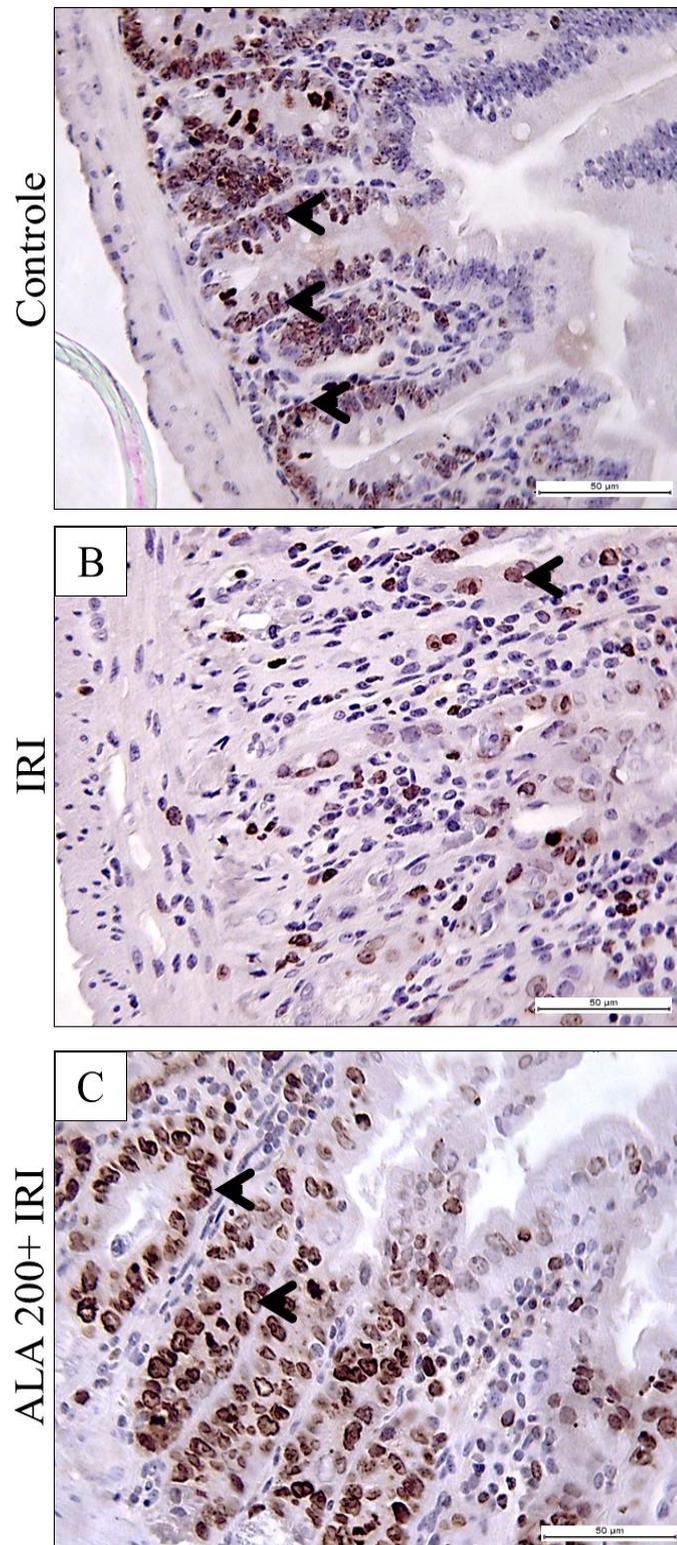
### **5.8 Efeito do ALA na imunomarcção de Ki67 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

O Ki67 é uma proteína presente em células em divisão celular, sendo um importante marcador de proliferação celular.

No intestino, em condições fisiológicas (representada pelo grupo controle), observa-se intensa imunomarcção positiva para Ki67 principalmente nas criptas duodenais (figura 17A). Ao passo que irinotecano a reduziu de forma acentuada nas criptas duodenais (figura 17B). No entanto, ALA (na dose de 200 mg/kg) aumentou a imunomarcção de Ki67 nas criptas do duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (figura 17C).

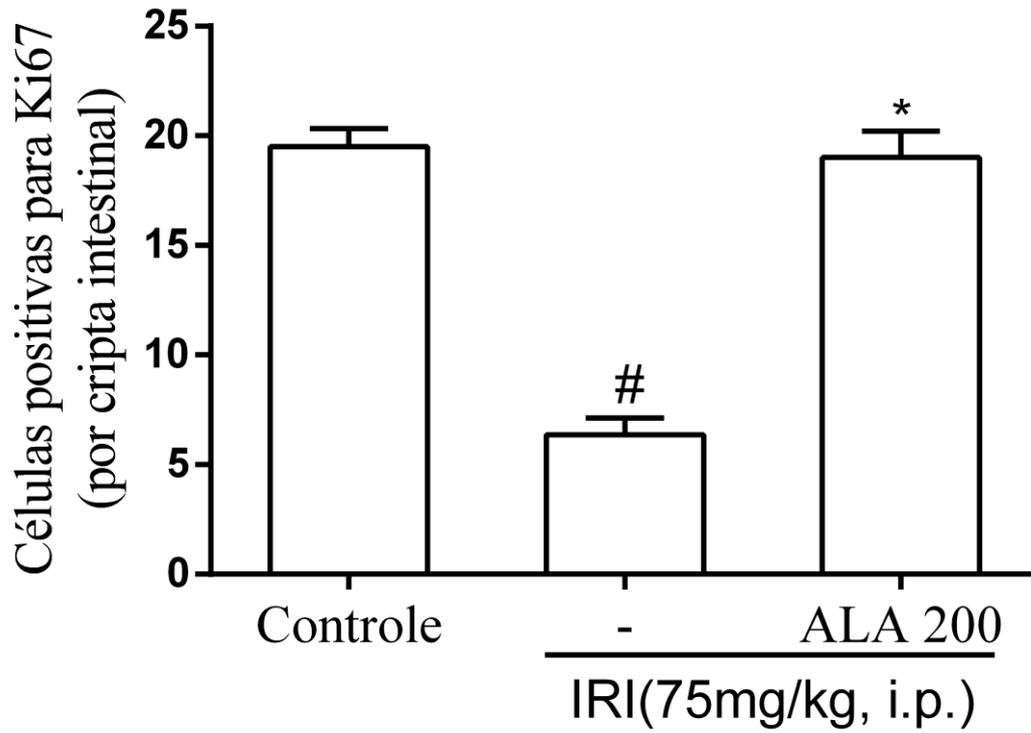
Ao realizar a contagem das células positivas para Ki67 nas criptas duodenais, observou-se que irinotecano diminuiu ( $p < 0,05$ ,  $6,36 \pm 0,7$ ), em cerca de 70%, o número de células com imunomarcção positiva para Ki67 nas criptas do duodeno quando comparado ao grupo controle ( $19,5 \pm 0,8$ ). Enquanto que ALA (na dose de 200 mg/kg,  $19,0 \pm 1,2$ ) reverteu ( $p < 0,05$ ) os efeitos do irinotecano na imunomarcção de Ki67 das células das cripta do duodeno (figura 18).

Figura 17 – ALA aumenta a imunomarcção de Ki67 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



Segmentos do duodeno foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para Ki67, que é um marcador de proliferação celular. Observa-se redução da imunomarcção para Ki67 nas criptas duodenais de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano (painel B) quando comparado ao controle (painel A). Enquanto que ALA na dose de 200 aumenta a imunomarcção desse marcador de proliferação celular nas criptas duodenais de animais submetidos à mucosite intestinal por irinotecano (painel C) quando comparado ao grupo IRI (painel B). Todos os painéis foram obtidos na escala de 50 µm.

Figura 18 - ALA aumenta o número de células imunopositivas para Ki67 no duodeno de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



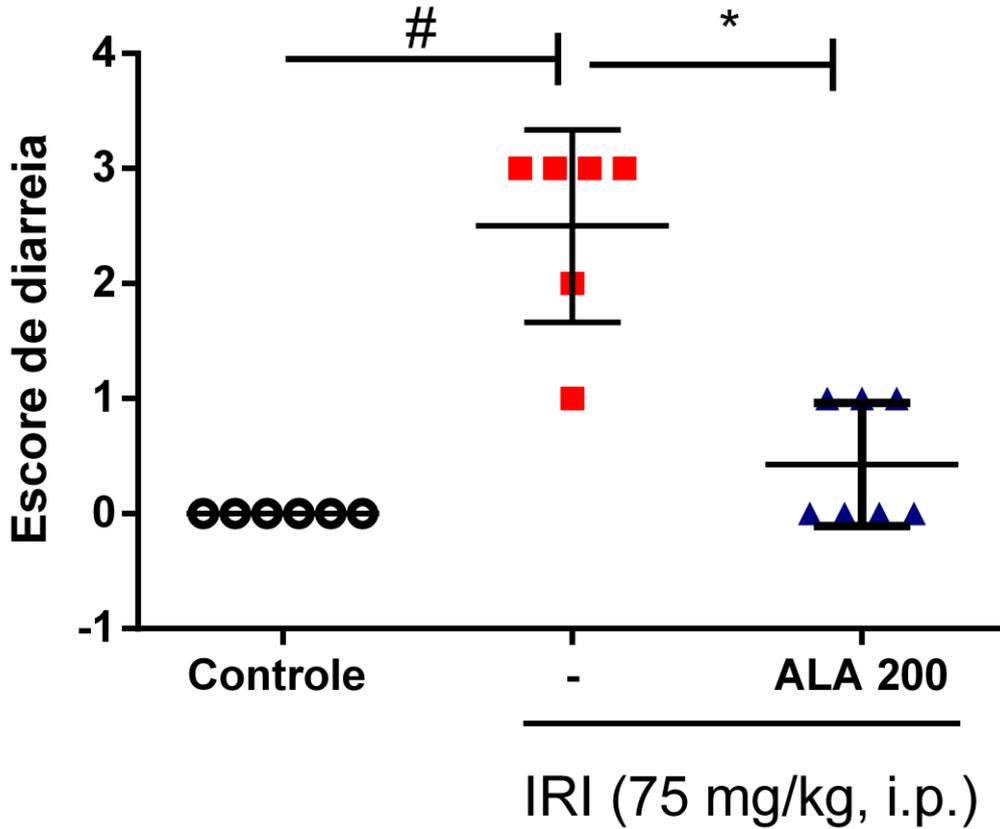
Segmentos do duodeno foram removidos e processados para a realização de imunohistoquímica para Ki67, que é um marcador de proliferação celular. Foram fotografados de 8 a 10 campos/corte histológico (escala de 50  $\mu$ m). As células imunopositivas para IL-1 $\beta$  foram quantificadas por meio do software ImageJ. Observa-se que irinotecano diminui o número de células positivas para Ki67/cripta intestinal quando comparado ao grupo controle. Enquanto que ALA aumenta essa imunomarcção nas criptas duodenais de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM do número de células positivas para Ki67 (por cripta duodenal). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo controle e \*  $p < 0,05$  vs grupo IRI.

### **5.9 Efeito do ALA no escore de diarreia de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

A diarreia é um dos principais efeitos colaterais presente em pacientes que utilizam quimioterápicos, como irinotecano. Essa condição clínica também é reproduzida em modelos animais de mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Conforme demonstrado na figura 19, irinotecano aumentou ( $p < 0,0009$ ) o escore de diarreia, ocasionando na grande maioria dos animais diarreia grave (representada pelo escore 3), quando comparado ao grupo controle (escore 0, ausência de diarreia). Ao passo que ALA reduziu ( $p < 0,0009$ ) de forma acentuada o escore de diarreia em animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Figura 19 – ALA reduz a diarreia em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



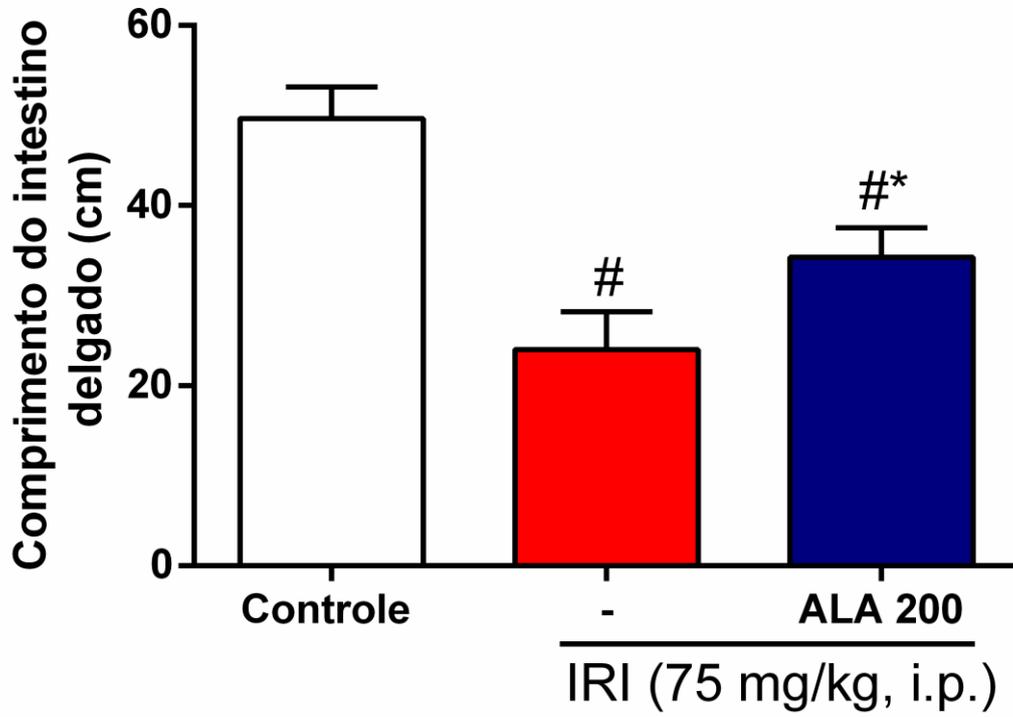
Camundongos Swiss (n=6 ou 7) receberam salina (Grupo controle, 0,9%, i.p.) ou irinotecano (Grupo IRI, 75 mg/Kg, i.p. durante quatro dias). Uma hora antes da administração do quimioterápico, administrou-se ALA (Grupo ALA 200+irinotecano, 200 mg/Kg, v.o.) durante quatro dias. No 7º dia do protocolo experimental, a região perianal dos camundongos foi observada para o estabelecimento do escore de diarreia de acordo com uma escala de 0 a 3. O escore 0 equivale a presença de fezes sólidas e ausência de sujidade e 3 equivale a fezes úmidas com bastante sujidade perianal. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana, onde #  $p < 0,0009$  vs grupo controle e \*  $p < 0,0009$  vs grupo IRI.

### **5.10 Efeito do ALA no comprimento do intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

Pacientes que utilizam irinotecano podem apresentar dor abdominal que pode estar associada a alterações na motilidade gastrointestinal. Essas alterações podem ser evidenciadas por meio da mensuração do comprimento do intestino delgado.

De acordo com os dados apresentados na figura 20, irinotecano diminuiu ( $p < 0,0001$ ,  $25,5 \pm 1,5$ ) o comprimento do intestino delgado, indicando encurtamento do músculo liso intestinal, quando comparado ao grupo controle ( $49,6 \pm 1,4$ ). Enquanto que ALA (na dose de 200 mg/kg,  $34,3 \pm 1,6$ ) reverteu ( $p < 0,0001$ ) esse efeito no intestino delgado de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Figura 20 – ALA reverte o encurtamento do intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o intestino delgado foi coletado para mensurar o seu comprimento. Irinotecano reverte a atrofia no intestino delgado quando comparado ao grupo controle. Ao passo que ALA (200 mg/kg) aumenta o comprimento do intestino delgado de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os valores foram apresentados como média  $\pm$  EPM do comprimento do intestino delgado em cm. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,0001$  vs grupo controle e \*  $p < 0,0001$  vs grupo IRI.

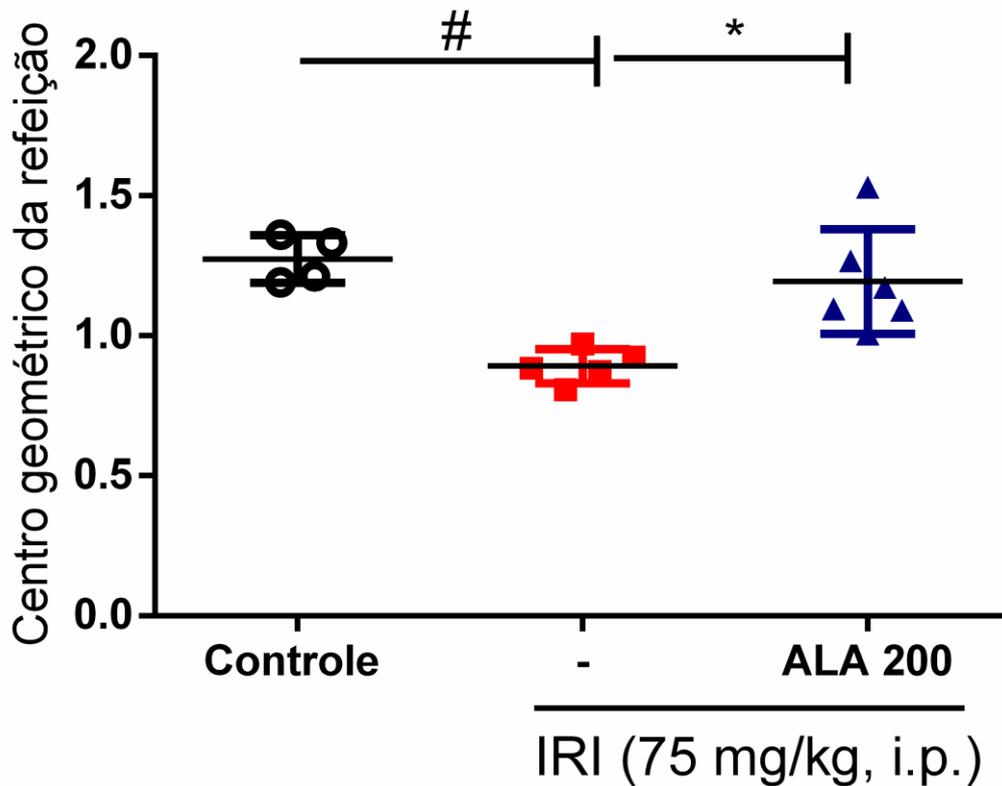
### **5.11 Efeito do ALA no trânsito intestinal de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

No sétimo dia do protocolo experimental avaliou-se o trânsito intestinal por meio do método do vermelho de fenol. Geralmente, pacientes tratados com irinotecano apresentam dismotilidades intestinais, como aumento do trânsito intestinal. Este também é reproduzido no modelo experimental de mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Em relação ao centro geométrico da refeição teste (figura 21), observou-se que irinotecano o reduziu ( $p < 0,002$ ,  $0,8 \pm 0,02$ ) em relação ao grupo controle ( $1,2 \pm 0,04$ ), indicando que a refeição teste concentrou-se no estômago (por retardo do esvaziamento gástrico) e apresentou-se em menor nível nos segmentos intestinais (por aumento do trânsito intestinal). Ao passo que ALA (na dose de 200 mg/kg) aumentou ( $p < 0,002$ ,  $1,13 \pm 0,07$ ) o centro geométrico de massa em animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

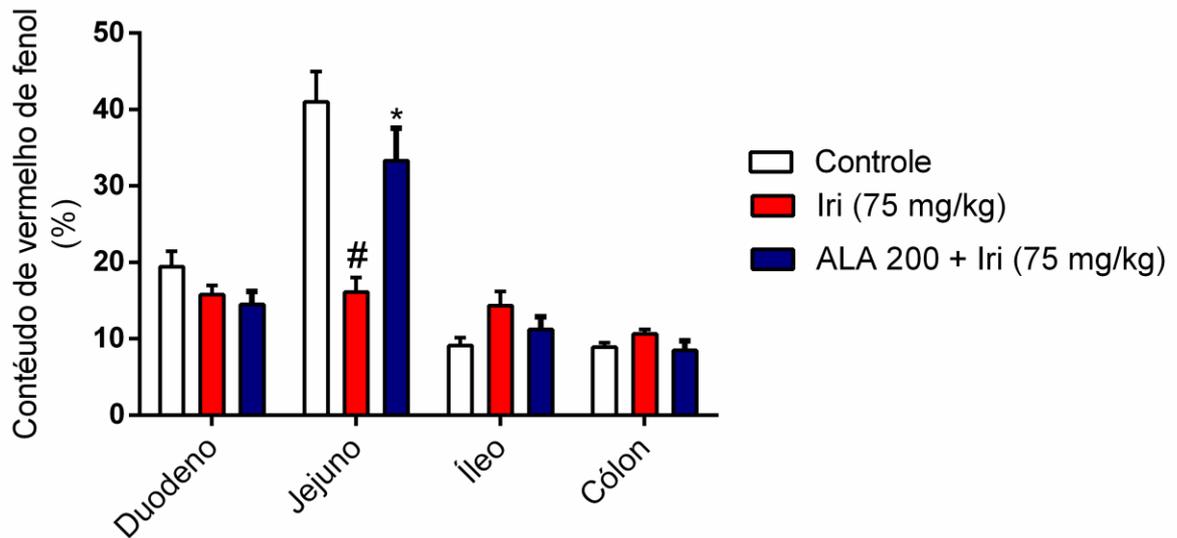
Ao mensurar a porcentagem de vermelho de fenol presente no duodeno, jejuno, íleo e cólon (figura 22), observou-se que irinotecano reduziu ( $p < 0,0001$ ) o conteúdo de vermelho de fenol (%) no jejuno, em torno de 50%, quando comparado ao grupo controle. Enquanto que ALA (na dose de 200mg/kg) aumentou ( $p < 0,0001$ ), em torno de 173%, o conteúdo de vermelho de fenol no jejuno, de camundongos submetidos à mucosite intestinal experimental.

Figura 21 – Efeito do ALA no centro geométrico da refeição teste de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



No 7º dia do protocolo experimental, os animais receberam refeição teste (vermelho de fenol por gavagem), 20 min depois foram eutanasiados, a porção proximal (duodeno), a porção medial (jejuno) e a porção distal (íleo) foram isoladas e processadas para a análise da retenção fracional da refeição teste. Em seguida, mensurou-se o centro geométrico da refeição. Irinotecano diminui o centro geométrico da refeição quando comparado ao grupo controle. Ao passo que ALA (200 mg/kg) o aumenta em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os valores foram apresentados como média ± EPM do centro geométrico da refeição. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,002$  vs grupo controle e \*  $p < 0,002$  vs grupo IRI.

Figura 22 – Efeito do ALA no conteúdo de vermelho de fenol no intestino de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



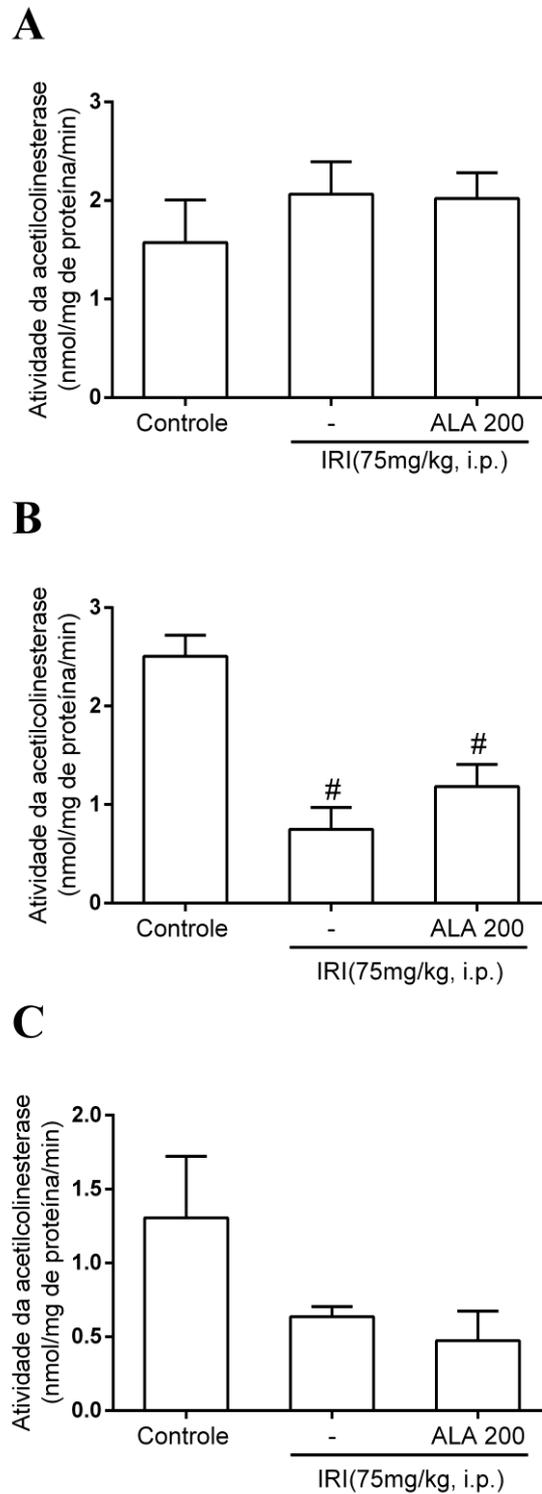
No 7º dia do protocolo experimental, os animais receberam refeição teste (vermelho de fenol por gavagem), 20 min depois foram eutanasiados a porção proximal (duodeno), a porção medial (jejuno) e a porção distal (íleo) foram isoladas e processadas para a análise da retenção fracional da refeição teste. Irinotecano reduz a porcentagem de conteúdo de vermelho de fenol no jejuno quando comparado ao grupo controle. Ao passo que ALA (200 mg/kg) diminui os efeitos do irinotecano nesses segmentos de animais submetidos à mucosite intestinal. Os valores foram apresentados como média ± EPM da porcentagem de conteúdo de vermelho de fenol. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,0001$  vs grupo controle e \*  $p < 0,0001$  vs grupo IRI.

### **5.12 Efeito do ALA na atividade da acetilcolinesterase em camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.**

Para investigar o mecanismo pelo qual ALA diminui o trânsito intestinal e a diarreia, mensurou-se a atividade da acetilcolinesterase (marcador indireto dos níveis de acetilcolina, um neurotransmissor excitatório, tecidual).

Conforme apresentado na figura 23, irinotecano diminuiu ( $p < 0,05$ ) a atividade da acetilcolinesterase apenas no jejuno (figura 23B,  $0,07 \pm 0,02$ ) quando comparado ao grupo controle ( $2,5 \pm 0,2$ ). Ao passo que ALA não reverteu esse efeito em nenhum dos segmentos avaliados.

Figura 23 – Efeito do ALA na atividade da acetilcolinesterase no intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.



No 5º dia do protocolo experimental, segmentos do duodeno (A), do jejuno (B) e do íleo (C) foram coletados para avaliar a atividade da acetilcolinesterase. Os valores foram apresentados como média ± EPM da atividade da acetilcolinesterase em nmol/mg de proteína/min. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde #  $p < 0,05$  vs grupo controle.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que o ALA foi capaz de reduzir o recrutamento de neutrófilos, estresse oxidativo e atenuar as alterações histológicas induzidas por irinotecano no duodeno. Além disso, também observou-se que o ALA diminuiu a diarreia, melhorou o trânsito intestinal e aumentou a sobrevivência dos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por irinotecano.

O modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano foi primeiramente descrito por Ikuno et al (1995) e sofreu adaptações de acordo com o tipo de animal e a obtenção das características clínicas que mimetizam as condições apresentadas pelos pacientes em uso desse quimioterápico. Dessa forma, a dose de irinotecano utilizada neste estudo para induzir a mucosite intestinal em camundongos foi de 75mg/kg, conforme utilizada por estudos anteriores (ARIFA *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2015). Essa dose é utilizada devido a sua capacidade de mimetizar os achados clínicos como diarreia, redução da sobrevivência e perda de peso, bem como inflamação intestinal e alterações da motilidade intestinal, conforme demonstrado pelo presente estudo. Em ratos, a dose de irinotecano usada varia de 60 a 250 mg/kg (BOWEN *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2012; NAKAO *et al.*, 2012; SEZER; USTA; CICIN, 2009; STRINGER *et al.*, 2009). Enquanto que as doses utilizadas em camundongos é de 60 mg/kg (GUABIRABA *et al.*, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014) ou 75 mg/kg (ARIFA *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2015).

Primeiramente, exibiu-se no presente estudo que o irinotecano reduziu a perda de peso, conforme apresentado por outros estudos (ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014; MELO *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2015). Enquanto que o ALA diminuiu essa perda de peso induzida por irinotecano. De forma semelhante, ALA promoveu ganho de peso em ratos submetidos ao estresse por desmame precoce (FAN *et al.*, 2015) e camundongos submetidos à inflamação intestinal induzida por radiação (JEONG *et al.*, 2016). Vários fatores tem mostrado contribuir para a perda de peso promovida por irinotecano, como náuseas, inapetência, perda de integridade da barreira epitelial intestinal e diarreia. Além disso, a perda de peso acentuada induzida pelos quimioterápicos vem sendo associada à redução da sobrevivência (PERSSON; GLIMELIUS, 2002).

Na etapa seguinte, demonstrou-se no presente estudo que o irinotecano ocasionou redução das vilosidades intestinais com vacuolização de células epiteliais intestinais, perda da arquitetura e necrose das criptas intestinais, incluindo intenso infiltrado de células inflamatórias na mucosa intestinal, conforme já observado por estudos anteriores (ARIFA *et*

*al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014; MELO *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2015). No entanto, ao tratar os animais com ALA, observou-se redução dessas alterações histológicas induzidas por irinotecano no duodeno, bem como aumento das vilosidades intestinais. De forma similar, ALA promoveu aumento das vilosidades do intestino delgado de animais submetidos ao estresse por desmame precoce (FAN *et al.*, 2015) e à inflamação intestinal induzida por radiação (JEONG *et al.*, 2016).

Devido a esses achados, levantou-se a hipótese de que a recuperação do comprimento das vilosidades poderia estar associado com algum efeito do ALA na proliferação de células epiteliais intestinais, logo realizou-se uma imunohistoquímica para Ki67. Os achados deste estudo evidenciaram que o ALA reverteu o efeito do irinotecano na proliferação de células epiteliais da cripta duodenal, aumentando a imunomarcagem de Ki67.

Em linhagens de células cancerígenas da tireóide e do pulmão, ALA inibiu a proliferação dessas células (FEUERRECKER *et al.*, 2012; MICHIKOSHI *et al.*, 2013). Portanto, sugere-se que o efeito do ALA na proliferação de células da cripta intestinal observado no presente estudo foi por mecanismo indireto. Possivelmente, esse efeito observado no presente estudo foi secundário a redução da inflamação pelo ALA.

Devido ao ALA ser considerado um potente antioxidante, investigou-se os níveis de GSH. Dessa forma, observou-se neste estudo que ALA diminuiu o consumo de GSH na mucosite intestinal induzida por irinotecano. Assim como no presente estudo, estudos anteriores já haviam demonstrado que irinotecano reduzia consideravelmente os níveis de GSH (ALVAREGA *et al.*, 2016; ARIFA *et al.*, 2014). ALA, como já esperado, aumentou os níveis de GSH na mucosa duodenal de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Achado semelhante também foi observado em modelo de lesão renal induzida por metotrexato em ratos tratados com ALA (ÇAKIR *et al.*, 2015).

Um dos mecanismos pelos quais ALA estimula o aumento de GSH é por meio da fosforilação e translocação do fator nuclear de transcrição derivado de eritróide 2 (Nrf2). Em condições normais, Nrf2 se encontra inativo no citoplasma ligado à proteína Kelch like-ECH-associado proteína 1 (Keap1) a qual impede sua translocação para o núcleo. Este fator é ativado por alterações do estado redox da célula, tais como o aumento das concentrações de EROs, subprodutos de danos oxidativos e reduzida capacidade antioxidante (SHI *et al.*, 2016). No núcleo, Nrf2 interage com o elemento de resposta ao antioxidante para iniciar a transcrição de genes e proteínas que contribuem para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (YANG *et al.*, 2016).

ALA também reduziu o recrutamento de neutrófilos para o duodeno de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano, observado de forma indireta por meio nos níveis da atividade de MPO. De forma semelhante, ALA também reduziu os níveis de MPO na lesão pulmonar induzida por LPS e na colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (LIN *et al.*, 2013; KOLGAZI *et al.*, 2006).

Os neutrófilos liberam enzimas como metaloproteinases (MMP-9) e MPO que contribuem para a lesão tecidual quando liberados em grandes quantidades por degradarem o colágeno tecidual (KOLACZKAWSKA; KUBES, 2013). Durante a inflamação, as citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento estimulam o recrutamento de neutrófilos para o sítio da lesão. Nesse contexto, IL-1 $\beta$  tem demonstrado estimular a migração de neutrófilos (OLIVEIRA *et al.* 2008). Essa citocina pró-inflamatória ativa NF $\kappa$ B, que ao ser ativado se transloca para o núcleo, estimulando a transcrição de genes de diversas quimiocinas, de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias (LAWRENCE, 2009). Neste aspecto as quimiocinas, como a IL-8, estimulam diretamente a migração dos neutrófilos (ZEILHOFER; SCHORR, 2000). Apesar de não ter sido demonstrado no presente estudo, já foi demonstrado previamente que irinotecano aumenta IL-8 na mucosite intestinal experimental (ARIFA *et al.*, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014; MELO *et al.*, 2008)

Ao avaliar a expressão proteica de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , observou-se que ALA diminuiu a expressão apenas de IL-6 e IL-1 $\beta$  na mucosite intestinal induzida por irinotecano. Na imunohistoquímica, demonstrou-se que a redução de IL-1 $\beta$  ocorreu principalmente no epitélio. Assim como no presente estudo, ALA também diminuiu IL-1 $\beta$  e IL-6 na lesão intestinal induzida pela radiação em camundongos (JEONG *et al.*, 2016).

A IL-6 é considerada como uma citocina pleiotrópica por agir de forma pró-inflamatória e anti-inflamatória dependendo dos seus níveis teciduais e da via ativada. Durante a inflamação IL-6 pode ser liberada por células epiteliais intestinais, mastócitos, células gliais e neurônios entéricos, estimulando via NF $\kappa$ B a expressão das citocinas IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  (SCHELLER *et al.*, 2011). Nesse contexto, já foi demonstrado previamente que ALA modula a ativação de NF $\kappa$ B em monócitos, assim como também reduziu a ativação desse fator de transcrição na lesão intestinal induzida por radiação em modelo experimental (JEONG *et al.*, 2016; LEE; HUGHES, 2002). No presente estudo não demonstramos a redução da ativação de NF $\kappa$ B de forma direta, porém a diminuição de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  promovido por ALA na mucosite intestinal induzida por irinotecano podem indicar de forma indireta esse processo.

Na etapa seguinte, investigamos se o ALA seria capaz de melhorar a diarreia e as alterações na motilidade intestinal induzidas por irinotecano, avaliando o escore de diarreia e trânsito intestinal. Os resultados desse estudo demonstraram que o irinotecano causou diarreia grave e aumentou o trânsito intestinal, conforme já apresentando por estudos anteriores (ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012, 2014). Enquanto que o ALA foi capaz de reverter essas alterações induzidas por irinotecano. Semelhante aos achados do presente estudo, ALA já demonstrou previamente atenuar a diarreia em ratos após desmame precoce do aleitamento materno (FAN *et al.*, 2015).

Para investigar o mediador envolvido nesse efeito do ALA na motilidade intestinal e diarreia, realizou-se a avaliação da atividade da acetilcolinesterase. No presente estudo, irinotecano diminuiu a atividade da acetilcolinesterase apenas no jejuno, mas não no duodeno. No entanto, ALA não preveniu a inibição dessa enzima induzida por irinotecano. Esse achado indica que os efeitos de ALA na prevenção da diarreia e das alterações da motilidade não ocorrem via acetilcolinesterase.

O irinotecano ao inibir a atividade da acetilcolinesterase, ele promove a síndrome colinérgica (DODDS; RIVORY, 1999; MORTON *et al.*, 1999). A acetilcolinesterase regula os níveis de acetilcolina presentes no meio extracelular. A acetilcolina é o principal neurotransmissor excitatório no intestino (ROSAS-BALLINA; TRACEY, 2009). Apesar de ALA não ter revertido o efeito do irinotecano na atividade da acetilcolinestase, a acetilcolina que está presente nos segmentos intestinais poderiam contribuir para o efeito anti-inflamatório do ALA na mucosite intestinal induzida por irinotecano, porém não houve relação direta para esse efeito, uma vez que ALA apresentou melhor resultado no duodeno que não apresentou alterações na atividade da acetilcolinesterase.

Em adição, também mostrou-se no presente estudo que ALA diminuiu o encurtamento do músculo liso intestinal induzido por irinotecano. Estudos prévios já demonstraram que irinotecano promove o encurtamento do músculo liso intestinal por promover hipercontratilidade desse músculo intestinal (ARIFA *et al.*, 2014; GUABIRABA *et al.*, 2014).

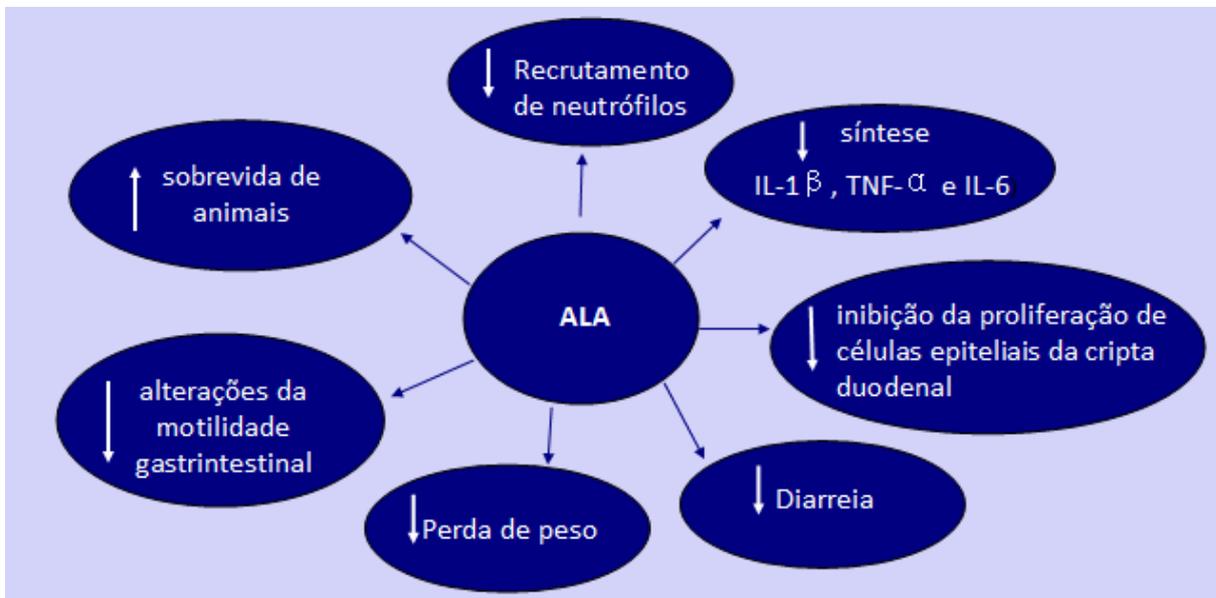
Devido ao ALA ter atenuado as alterações histológicas, a inflamação, a diarreia e a dismotilidade induzidas por irinotecano, levantou-se a hipótese de que ele seria capaz de melhorar a sobrevivência de camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano. Os dados desse estudo demonstraram que o irinotecano reduziu a sobrevivência dos camundongos submetidos à mucosite intestinal. Ao passo que o ALA foi capaz de melhorar a sobrevivência dos camundongos submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Por fim, este estudo evidenciou que irinotecano diminui a proliferação de células epiteliais da cripta intestinal, promovendo o seu desarranjo e reduzindo as vilosidades intestinais. A lesão destas estruturas é potencializada, pelo aumento de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , com conseqüente recrutamento de neutrófilos. Em conjunto, esses mediadores ocasionam alterações da motilidade intestinal, como diarreia, retenção gástrica e aceleração do trânsito intestinal, resultando em perda de peso e redução da sobrevida de animais submetidos a mucosite intestinal induzida por irinotecano. No entanto, ALA previne essas alterações induzidas pelo irinotecano aumentando a proliferação de células epiteliais da cripta duodenal e inibindo a síntese de IL-1 $\beta$  pelo epitélio intestinal, diminuindo assim a inflamação induzida por irinotecano. Além disso, a redução de IL-6 sugere importante neuroproteção entérica pelo ALA evidenciado pela melhora das dismotilidades intestinal induzida por irinotecano. Em conjunto, esses efeitos do ALA contribuíram para a redução da perda de peso e a melhora na sobrevida dos animais submetidos à mucosite intestinal induzida por irinotecano.

## 7 CONCLUSÃO

ALA previne a inflamação (reduzindo o recrutamento de neutrófilos e a síntese de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) e reduz a inibição da proliferação de células epiteliais da cripta duodenal induzidos por irinotecano. Além disso, ALA atenua a diarreia, a perda de peso e as alterações da motilidade gastrointestinal induzidas por irinotecano, bem como aumenta a sobrevivência de animais submetidos à mucosite intestinal experimental.

É necessário o desenvolvimento de mais estudos para desvendar o mecanismo pelo qual o ALA induz esses importantes efeitos que atenuam essas alterações induzidas por irinotecano.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIMONTI, A. *et al.* New approach to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer Treat. Rev.**, v.30, p.555-562, 2004.
- ALPHA-LIPOIC ACID (Monograph). **Alternative Medicine Review**. v.11, n.3, p.232-237, 2006.
- ALVARENGA, E. M. *et al.* Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. **Chemico-Biological Interactions**. v.260, p.129-140, 2016.
- ANDREYEV, J. *et al.* Guidance on the management of diarrhoea during cancer chemotherapy. **Lancet Oncol.**, v. 15, n. 10, p. e447-e460, 2014.
- ARIFA, R. D. *et al.* Inflammasome activation is reactive oxygen species dependent and mediates irinotecan-induced mucositis through IL-1 $\beta$  and IL-18 in mice. **Am J Pathol**. v.184, n.7, p.2023-2034, 2014.
- BOWEN, J. M. *et al.* Probiotic treatment reduces chemotherapy induced diarrhea and weight loss. **Cancer Biol Ther**. v.6, n.9, p.1449-1454, 2007.
- BOWEN, J. M; GIBSON, R. J; KEEFE, D. M. Animal models of mucositis: implications for therapy. **J Support Oncol**. v.9, n.5, p:161-168, 2011.
- ÇAKIR, T. *et al.* The effect of alpha lipoic acid on rat kidneys in methotrexate induced oxidative injury. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. v.19, n.11, p.2132-2139, 2015.
- CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: Structure, function and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.**, v.70, p.369-413, 2001.
- CHESTER J. D. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral cyclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 6, p. 1125-1132, 2003.
- CHOI, K. *et al.* Alpha-lipoic acid treatment is neurorestorative and promotes functional recovery after stroke in rats. **Molecular Brain**. v.8, n.9, p:1-16, 2015.
- CONSTANTINESCU, A; TRITSCHLER, H; PACKER, L. Alpha-lipoic acid protects against hemolysis of human erythrocytes induced by peroxy radicals. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v.33, p.669-679, 1994.
- COSTA, D. V. S. **Papel da via S100 $\beta$ /RAGE/NF $\kappa$ B na patogênese da mucosite intestinal experimental por 5-Fluorouracil: Desregulação de células gliais e de neurônios entéricos.** 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- CREMER, D. R. *et al.* Long-term safety of alpha-lipoic acid (ALA) consumption: A 2-year study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.46, p: 193-2001, 2006.

DE SOUSA, C. N. S. et al. Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. **Psychiatry Research**. v.230, p.211–219, 2015.

DODDS, H. M. *et al.* 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; RIVORY, L. P. The mechanism for the inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (CPT-11). **Mol Pharmacol**. v.56, p.1346-1353, 1999.

DUNCAN, M; GRANT, G. Review article: oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. **Aliment. Pharmacol**, v.18, p. 853-874, 2003.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p.88-95, 1961.

FAN, P. *et al.* Supplemental lipoic acid relieves post-weaning diarrhoea by decreasing intestinal permeability in rats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.101, n.2017, p.136–146, 2015.

FEUERECKER, B. *et al.* Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. **Cancer Biol Ther**. v.13, p.1425–1435, 2012.

GANDIA, D. *et al.* CPT-11-induced cholinergic effects in cancer patients (letter). **J. Clin. Oncol.**, v.11, p. 196-197,1993.

GIBSON, R. J. *et al.* Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J. Gastroenterol Hepatol.**, v.18, p.1095-1100, 2003.

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

GRUPTA, E. et al. Metabolic fate of irinotecano in humans: Correlation of glucuronidation with diarrhea. **Cancer Res**, v.54, p.3723-3725, 1994.

GUABIBARA, R. *et al.* IL-33 targeting attenuates intestinal mucositis and enhances effective tumor chemotherapy in mice. **Mucosal Immunology**. v.7, n.5, p.1079-1093, 2014.

GLIMELIUS, B. Benefit-risk assessment of irinotecan in advanced colorectal cancer. **Drug Saf**. v.28, p. 417–433, 2005.

HAN, D. *et al.* Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. **BioFactors**, v.6, p.321-338, 1997.

HUMERICHHOUSE, R. *et al.* Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. **Cancer Res**. v.60, p. 1189-1192, 2000.

- IKUNO, N. *et al.* Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and cecum. **J Natl Cancer Inst.** v.87, p. 1876–1883, 1995.
- JEONG, B. K. *et al.* Effect of alpha-lipoic acid on radiation-induced small intestine injury in mice. **Oncotarget.** v.7, n.12, p.15105-15117, 2016.
- JUSTINO, P. F. C. *et al.* Regulatory role of *Lactobacillus acidophilus* on inflammation and gastric dysmotility in intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.75, p.559–567, 2015.
- KAWATO, Y. *et al.* Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the Camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. **CANCER RESEARCH.** v.51, p. 4187-4191, 1991.
- KEEFE, D.M. *et al.* Mucositis study section M. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer.**, v.109, p. 820-831, 2007.
- KIM, M. S. *et al.* Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. **Nature Medicine.** v.10, p.727-733, 2004.
- KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY.** v.13, p. 159-175, 2013.
- KONRAD, T. *et al.* Alpha-Lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care.** v.22, p.280-287, 1999.
- KOUFAKI, M. Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011-2014). **Expert Opin Ther Pat.** v.24, p.993-1005, 2014.
- KOLGAZI, M. *et al.*  $\alpha$ -Lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. **Journal of gastroenterology and hepatology.** v.22, p.1859 -1865, 2006.
- KURITA, A. *et al.* Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.46, n.3, p.211-220, 2000.
- LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** p. 1-10, 2009.
- LEE, A. H; HUGHES, A. D. Alpha-lipoic acid modulates NF- $\kappa$ B activity in human monocytic cells by direct interaction with DNA. **Experimental Gerontology.** v.37, n.2, p.401-410, 2002.
- LEXIS, L. A; FASSETT, R. G; COOMBES, J. S.  $\alpha$ -Tocopherol and  $\alpha$ -Lipoic Acid Enhance the Erythrocyte Antioxidant Defence in Cyclosporine A-Treated Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology,** v.98, p: 68–73, 2006.

- LIMA-JÚNIOR, R. C. P. *et al.* Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.69, p.931-942, 2012.
- LIMA-JÚNIOR, R. C. P. *et al.* Targeted inhibition of IL-18 attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.171, p.2335-2350, 2014.
- LIN, X. B. *et al.* Irinotecan (CPT-11) Chemotherapy Alters Intestinal Microbiota in Tumour Bearing Rats. **PLOS ONE.** v. 7, n.7, p.e39764, 2012.
- LIN, Y; LAI, Y; CHOU, T. The protective effect of alpha-lipoic acid in Lipopolysaccharide-induced acute lung injury is mediated by heme oxygenase-1. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.** p.1-12, 2013.
- LIU, G. X. *et al.* Glial-derived neurotrophic factor reduces inflammation and improves delayed colonic transit in rat models of dextran sulfate sodium-induced colitis. **Int Immunopharmacol.** v.19, n.1, p145-152, 2014.
- MACPHERSON, B. R; PFEIFFER, C. J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion.** v.17, n.2, p.135-150, 1978.
- MARANGON, K. *et al.* Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, p.1114–1121, 1999.
- MATHIJSEN, R. H. *et al.* Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **Journal of the Cancer Institute.** v.96, n.21, p.1585-1591, nov. 2004.
- MELO, M. L. *et al.* Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.61, n.5, p.775-784, 2008.
- MICHIKOSHI, H. *et al.* alpha-Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells. **Cancer Lett.** v.335, p.472–478, 2013.
- MOREELS, T. G. *et al.* Effect of *Schistosoma mansoni*-induced granulomatous inflammation of murine gastrointestinal motility. **Am. J. Physiol.** v.280, p.G1030–G1042, 2001.
- MORIKAWA, T; YASUNO, R; WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid? Identification of a mouse cDNA encoding  $\alpha$ -lipoic acid synthase located in mitochondria. **FEBS Letter**, v.498, n.1, p.16–21, 2001.
- MORTON, C. L. *et al.* The anticancer prodrug CPT-11 is a potent inhibitor of acetylcholinesterase but is rapidly catalyzed to SN-38 by butyrylcholinesterase. **Cancer Res.** v.59, p.1458-1463, 1999.

NAKAO, T. *et al.* Irinotecan injures tight junction and causes bacterial translocation in rat. **J Surg Res**, v.173, n.2, p. 341-347, 2012.

NOGUEIRA, L. T. **Alterações do sistema nervoso entérico e sua relação com mastócitos na mucosite intestinal induzida pelo irinotecano.** 2015. Tese. Doutorado em Ciências Morfológicas. Dinter: Universidade Federal do Rio de Janeiro – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

OBERLIES, N. H; KROLL, D J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **J Nat Prod**, v. 67, n. 2, p.129-35, 2004.

OLIVEIRA, S. H. P. *et al.* Neutrophil migration induced by IL-1 $\beta$  depends upon LTB<sub>4</sub> released by macrophages and upon TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  released by mast cells. **Inflammation**. v.31, n.1, 2008.

PACKER L. Alpha-lipoic acid: A metabolic antioxidant which regulates NF kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. **Drug Metab Rev.** v.30, p: 245–275. 1998.

PACKER L; TRITSCHLER, H. J, WESSEL, K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. **Free Radic Biol Med.** v.22, p.359–378, 1997.

PACKER, L; WITF, E. H; TRITSCHLER, H. J. Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v.19, n.2, p: 227-250, 1995.

PERSSON, C; GLIMELIUS, B. The relevance of weight loss for survival and quality of life in patients with advanced gastrointestinal cancer treated with palliative chemotherapy. **Anticancer Res.** v.22, n.6B), p.3661-3668, 2002.

PEREZ, O. G; CASTANEDA, R. E. G. Therapeutic perspectives on the combination of  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin E. **Nutrition Research**, v.26, p: 1– 5, 2006.

RATAIN, M. J. Irinotecan dosing: Does the CPT in CPT-11 stand for "Can't predict toxicity?". **Journal of Clinical Oncology.** v.20, n.1, p. 7-8, 2002.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Irinotecan- and 5-Fluorouracil-induced intestinal mucositis: insights into pathogenesis and therapeutic perspectives. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.78, p.881-893, 2016.

ROTEMBERG, M. L. *et al.* Phase I and pharmacokinetic trial of weekly CPT-11. **Journal of Clinical Oncology.** v.11, n.11, p.2194-2204, nov. 1993.

ROUGIER, P. *et al.* Phase II study of irinotecano in the treatment of advanced colorectal cancer in chemotherapy-naïve patients and pretreated with fluorouracil-based chemotherapy. **J Clin Oncol.**, v.15, p. 251-260, 1997.

RUBENSTEIN, E. B. *et al.* Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v.100, p.2026–2046, 2004.

SCULLY, C; SONIS, S; DIZ, P. D. Oral mucositis. **Oral Dis.** v.12, n.3, p:229-241, 2006.

SEDLAK, J; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** v.25, n.1, p.192-205, 1968.

SEN, C. K, PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB J.** v.10, n.7, p.709-720, 1996.

SEZER, A; USTA, U; CICIN, I. The effect of *Saccharomyces boulardii* on reducing irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea. **Med Oncol.** v.26, n.3, p.350-357, 2009.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1813, p.878-888, 2011.

SHI, C. et al.  $\alpha$ -Lipoic acid protects against the cytotoxicity and oxidative stress induced by cadmium in HepG2 cells through regeneration of glutathione by glutathione reductase via Nrf2/ARE signaling pathway. **Environ Toxicol Pharmacol.** v.45, p.274-281, 2016.

SINGH, U; JIALAL, I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. **Nutr. Rev.** v.66, p.646-657, 2008.

SMITH, A. R. *et al.* Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. **Current Medicinal Chemistry.** v.11, p.1135-1146, 2004.

SOARES, P. M. G. et al. Gastrointestinal dysmotility in 5-Fuorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol.** v.63, n.1, p.91-98, 2008.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer.** v.4, n.4, p.277-284, 2004.

STRINGER, A. M. et al. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Int. Exp Path.** v.90, p.489-499, 2009.

TAKASUNA, K. *et al.* Involvement of  $\beta$ -glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative Irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res.** v. 56, p. 3752-3757, 1996.

TAKIMOTO, C. H, ARBUCK, S. G. Topoisomerase I targeting agents: the camptothecins: In: CHABNER BA, LONGO DL. Cancer **Chemotherapy and biotherapy: principles and practice.** 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. Cap. 20, p.576-646, 2001.

TALLMAN, M. N.; RITTER, J. K.; SMITH, P. C. Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. **Drug Metab Dispos.** v. 33, n. 7, p. 977-983, 2005.

TRIVEDI, P. P; GENA, G. B. Role of  $\alpha$ -lipoic acid in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: Studies on inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis. **Food and Chemical Toxicology**. v.59, p.339–355, 2013.

VASCONCELOS, G. S. et al. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. **SCHIZOPHRENIA RESEARCH**. v. 165, p.163-170, 2015.

VENTO, S.; CAINELLI, F. Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. **Lancet Oncol.**, London, v. 4, n. 10, p. 595-604, 2003.

WALL, M. E. *et al.* 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. 3888–3890, 1966.

WANG, Z; SINHA, B. K. Interleukin-1 alpha-induced modulation of topoisomerase I activity and DNA damage: implications in the mechanisms of synergy with camptothecins in vitro and in vivo. **Mol Pharmacol**. v49, n.2, p.:269-275. Fev, 1996.

WENZL, H. H. Diarrhea in chronic inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol.* **Clin North Am**, v.41, n.3, p.651-675, 2012.

WONG, D. V. T. Mediação dos receptores TLR2, NOD1 e da proteína adaptadora MyD88 na modulação da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano. 2013. Tese. Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

WONG, D. V. T. et al. The adaptor protein Myd88 is a key signaling molecule in the pathogenesis of irinotecano-induced intestinal mucositis. **PLOS ONE**. v, 6, p.1-21, 2015.

YANG, T. et al. Alpha-lipoic acid reduces methylmercury induced neuronal injury in rat cerebral cortex via antioxidation pathways. **Environmental Toxicology**. p.1-13, 2016.

ZAMPA, G; MAGNOLFI, E; BORGOMASTRO, A. Premedication for irinotecan. **J Clin Oncol**, v.18, n.01, p.237, 2000.

ZEILHOFER, H. U; SCHORR, W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. **Current Opinion in Hematology**. v.7, p.178-182, 2000.

## APÊNDICE A – MATERIAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

### Fármacos

Fármacos	Fabricante	Código do produto
Irinotecan	Bergamo	39151
Ácido alfa-lipóico	Sigma-Aldrich	T5625

### Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
DAB	Dako	K3468
Dako <i>Pen</i>	Dako	52002
Diluinte do anticorpo	Spring Bioscience	ADS-125
DTNB	Sigma-Aldrich	D8130-5
HTAB	Sigma-Aldrich	-
Inibidor de protease	Sigma-Aldrich	P8340
Kit de citocinas para TNF- $\alpha$	R&D Systems	DY410
Kit de citocinas para IL-6	R&D Systems	DY406
O-dianosidina	Sigma-Aldrich	-
Peróxido de hidrogênio	Abcam	Ab64218
Reagente A e B (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY999
Reagente diluinte (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY995
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Tampão de lavagem 25x concentrado (dosagem de citocinas)	R&D Systems	895126
Vermelho de fenol	Dinâmica	-

### Soluções

Soluções	Preparo
Formol tamponado a 10%	6,5g de fosfato de sódio dibásico 4g de fosfato de sódio monobásico 800 mL de água destilada Após dissolver as substâncias, adicionar 100 mL de formaldeído 37%. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 10x)	80g de Cloreto de sódio 2g de KCl 11,4g de fosfato de sódio monobásico 4,5 g de fosfato de sódio dibásico 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 7,4. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 1x)	100 mL de PBS 10x 900 mL de água destilada
Tampão citrato (concentrado 10x)	29,4g de Citrato de sódio

	900 mL de água destilada Ajustar o pH para 6,0 Completar para 1000 mL.
Tampão citrato (concentrado 1x)	20 mL de tampão citrato 10x 180 mL de água destilada
Solução de DTNB	13,2 mg de DTNB 3,33 mL de metanol Observação: Proteger a solução da luz.
Tampão TRIS	4,84g de tris 10 mL de 0,2 M EDTA Ajustar o pH para 8,9

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



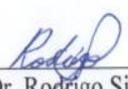
Universidade Federal do Ceará  
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITO DO ÁCIDO LIPÓICO E PAPEL DAS ALTERAÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE EXPERIMENTAL POR 5-FLUOROURACIL E POR IRINOTECANO”, protocolo nº31/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Emmanuel Prata de Souza, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	03/01/2016 a 20/12/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo Heterogênico Swiss
Nº de Animais	90
Peso/Idade	25g – 4 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016

  
 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
 Coordenador do CEUA - UFC

Daniely Tiana da Silva Costa

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734