

**MARIA LUISA PEREIRA DE MELO**

**PAPEL DE CITOCINAS, ÓXIDO NÍTRICO SINTASE E CICLOOXIGENASE-2  
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO AGENTE ANTITUMORAL  
CLORIDRATO DE IRINOTECANO (CPT-11) – EFEITO DA PENTOXIFILINA,  
TALIDOMIDA E CELECOXIBE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial para a obtenção do  
título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque  
Ribeiro

FORTALEZA  
2007

**MARIA LUISA PEREIRA DE MELO**

**PAPEL DE CITOCINAS, ÓXIDO NÍTRICO SINTASE E CICLOOXIGENASE-2  
NA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELO CLORIDRATO DE  
IRINOTECANO (CPT-11) – EFEITO DA PENTOXIFILINA, TALIDOMIDA E  
CELECOXIBE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 08 de junho de 2007.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

---

Profa. Dra. Helena Alves de Carvalho Sampaio  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza  
Universidade Federal do Ceará – UFC

Moacir, meu querido irmão, exemplo de trabalho e honestidade.  
Heloisa e Beatriz, dádivas de Deus.  
Antonele, pela paciência e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela confiança e pelo seu compromisso na orientação científica e efetiva participação em todas as etapas deste trabalho.

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito pelo seu incentivo, orientação, amizade e confiança.

À Profa. Dra. Mariana Lima Vale, pela sua valiosa participação em várias etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza e Prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha, pelo apoio indispensável em várias etapas desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima e à Profa. Dra. Helena Alves de Carvalho Sampaio, pela disponibilidade sempre em ajudar.

Aos estudantes de Iniciação Científica que contribuíram muito para a realização da presente pesquisa: Rudy Cysne Soares, Breno Augusto Albuquerque Oliveira, Ismar Vilanova, Sarah Barros Leal Montenegro Carvalho, Johan Vargas Silva e Regina de Carvalho Kinjo.

Aos amigos do LAFICA, especialmente Renata Leitão, Antoniella Sousa Gomes, Rosemary Souza Freire, Vilma de Lima, Pedro Marcos Gomes Soares, Ingrid Chaves Cavalcante, pela agradável convivência e solidariedade.

Aos técnicos, Maria Silvandira França Pinheiro e José Ivan Rodrigues de Sousa, pela amizade, colaboração e apoio inestimáveis.

À bibliotecária Rosane Maria Costa, da Biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela correção na normalização deste trabalho.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

Agradecimento especial à Universidade Estadual do Ceará e aos colegas do Colegiado de Nutrição, pela liberação de minhas atividades para realizar este Curso.

Aos colegas do Hospital Geral de Fortaleza, em especial a chefe do Setor de Nutrição, Maria de Lourdes Mota, pela compreensão e a amizade sempre presentes.

À minha irmã Maria de Fátima de Melo Barbosa, pelo apoio incondicional na revisão e correção deste trabalho.

À minha amiga Maria Olganê Dantas Sabry, pela sua participação na minha formação acadêmica e pelo incentivo e colaboração.

A todos que direta e indiretamente colaboraram em alguma etapa de minha jornada.

## RESUMO

**Papel de citocinas, óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 na mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) – efeito da pentoxifilina, talidomida e celecoxibe.** Autora: MARIA LUISA PEREIRA DE MELO. Doutorado em Farmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Defesa: 08 de junho de 2007. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

**Introdução:** O cloridrato de irinotecano (CPT-11) é um inibidor da topoisomerase I, clinicamente efetivo no tratamento de vários tipos de câncer. Apesar da mucosite intestinal (MI) acompanhada de severa diarreia ser o efeito colateral mais limitante do uso terapêutico do CPT-11, os exatos mecanismos que levam a estes efeitos não são estabelecidos. **Objetivo:** avaliar o envolvimento de mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico – NO e prostaglandinas – PGs) na patogênese dos eventos que acompanham a MI induzida pelo CPT-11; e estudar o efeito de inibidores da síntese e liberação de citocinas, como pentoxifilina (PTX) e talidomida (TLD), e de um inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (COX-2), o celecoxibe (CLX), na lesão intestinal induzida pelo CPT-11. **Material e Métodos:** camundongos *Swiss*, machos, foram tratados durante quatro dias consecutivos com CPT-11 (50, 75 e 100 mg/kg, i.p.) ou veículo (0,5 mL, i.p.), a fim de se obter a melhor dose capaz de induzir injúrias consistentes com o mínimo de letalidade. Os animais foram tratados com PTX (1,7, 5 e 15 mg/kg, s.c.), TLD (15, 30, 60 mg/kg, s.c), CLX (3, 10, 30 mg/kg, gavagem) ou veículo (0,5 mL, s.c. ou gavagem), um dia antes da primeira administração do CPT-11 (75 mg/kg), e diariamente, até o sacrifício, no quinto ou sétimo dia. Os seguintes parâmetros foram avaliados: diarreia, variação de massa corpórea, leucograma, sobrevida, análise histopatológica, atividade de mieloperoxidase (MPO), dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC) por ELISA e imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2 nas mucosas duodenais. **Resultados:** CPT-11 induziu diarreia significativa, acompanhada de perda acentuada de massa corpórea, leucopenia e redução da sobrevida. As alterações histopatológicas intestinais induzidas pelo CPT-11 caracterizaram-se pela presença de infiltrado inflamatório nas células da lâmina própria, perda da arquitetura das criptas e achatamento dos vilos. Observou-se ainda, aumento intestinal na atividade de MPO e dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC, além do aumento significativo na marcação imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2. O tratamento com PTX inibiu a diarreia tardia, reduziu as alterações histopatológicas, a atividade de MPO, e os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC, assim como a marcação imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS na mucosa duodenal, entretanto, não preveniu significativamente a perda de massa corpórea, a leucopenia e tampouco a mortalidade dos animais. O tratamento com TLD reduziu as lesões histopatológicas induzidas pelo CPT-11 na mucosa intestinal, os níveis intestinais de MPO e TNF- $\alpha$ , bem como a marcação imunohistoquímica de TNF- $\alpha$ , mas não foi capaz de prevenir a diarreia, a perda de massa corpórea, a leucopenia e a sobrevida. O tratamento com CLX não foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios e sistêmicos observados nos animais tratados com CPT-11. **Conclusão:** Estes resultados sugerem o envolvimento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC, NO e PGs na patogênese da MI induzida pelo CPT-11. PTX e TLD preveniram significativamente as alterações

histológicas e inflamatórias induzidas pelo CPT-11, entretanto, somente PTX foi capaz de inibir o curso da diarreia.

**Palavras-chave:** CPT-11, mucosite, citocinas, óxido nítrico sintase, ciclooxigenase-2, pentoxifilina, talidomida, celecoxibe.

## ABSTRACT

**Role of cytokines, nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the CPT-11-induced intestinal mucositis – effect of pentoxifylline, thalidomide and celecoxib.** MARIA LUISA PEREIRA DE MELO. Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology of the Medicine Faculty of the Ceará Federal University. Defense: 2007, June 08. Oriented by Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

**Introduction:** Irinotecan (CPT-11) is an inhibitor of DNA topoisomerase I and clinically effective against several cancers. A major toxic effect of CPT-11 is delayed diarrhea; however, the exact mechanism by which the drug induces diarrhea has not been established. **Purpose:** The aim of the present study was to elucidate the involvement of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC), nitric oxide (NO) and prostaglandins (PGs) in the pathogenesis of CPT-11-induced mucositis and the effects of the cytokine production inhibitors, pentoxifylline (PTX) and thalidomide (TLD), as well as the effects of the selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitor, celecoxib (CLX), in the CPT-11 induced intestinal mucositis, in mice. **Materials and methods:** the animals were treated with CPT-11 (50, 75 or 100 mg/kg, i.p.) or vehicle (0,5 ml, i.p.) daily for four days, in order to investigate the best dose able to induce intestinal mucositis without important mortality. In another set of experiments, the animals received PTX (1.7, 5, 15 mg/kg, s.c.), TLD (15, 30, 60 mg/kg, s.c.), CLX (3, 10, 30 mg/kg, oral gavage) or vehicle (0,5 ml, s.c. or oral gavage) one day before the 1<sup>st</sup> administration of CPT-11 (75 mg/kg; i.p.) and daily until the sacrifice, on the 5<sup>th</sup> or 7<sup>th</sup> day. The systemic parameters evaluated were: diarrhea, body mass variation, survival curve and leucogram. In addition, it was also performed histological analysis, myeloperoxidase (MPO) activity assay, duodenum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC by ELISA and immunohistochemistry for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS and COX-2 in the duodenal segments. **Results:** CPT-11 induced an important diarrhea, weight loss, leucopenia and mortality increase. It was also observed histopathological changes, such as shortened villi, loss of the crypt architecture and inflammatory cells infiltration, observed in the lamina propria, as well as, an increase in MPO activity, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC tissue levels and a marked immuno-staining for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS and COX-2. The treatment with PTX inhibited the delayed diarrhea and reduced the following parameters: histopathological alterations, MPO activity, tissue levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and KC, and the immuno-staining for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and iNOS, however, did not prevent leucopenia, weight loss and mortality. TLD significantly reduced all the inflammatory parameters evaluated, but was not able to prevent diarrhea, leucopenia, weight loss and mortality. On the other hand, CLX did not inhibit the inflammatory nor the systemic alterations induced by CPT-11. **Conclusion:** These results suggest an important role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC, NO and PGs in the pathogenesis of intestinal mucositis induced by CPT-11. PTX and TLD showed a protector effect in intestinal structures, however, only PTX reduced the severity of CPT-11-induced diarrhea.

Key words: irinotecan, mucositis, cytokines, nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, pentoxifylline, thalidomide, celecoxib.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
5-FU	5-Fluorouracil
AA	Ácido araquidônico
AChE	Acetilcolinesterase
AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
APC	7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]- carboniloxicamptotecina
ATP	Trifosfato de adenosina
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
BSA	Albumina sérica bovina
CE	Carboxilesterase
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CLX	Celecoxibe
cMOAT	Transportador canalicular multiespecífico de ânions orgânicos
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX	Ciclooxigenase
CPT-11	Cloridrato de irinotecano
DAB	3,3'diaminobenzidine-peróxido
DAINEs	Drogas antiinflamatórias não-esteróides
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDRF	Fator de relaxamento dependente do endotélio

ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
EGF	Fator de crescimento epidérmico
g	Grama
G-CSF	Fator estimulante da colônia de granulócitos
GLP-2	Peptídeo glucagon símile
GM-CSF	Fator estimulante das colônias de granulócitos e macrófagos
H&E	Hematoxilina e eosina
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN-	Interferon-
IGF-1	Fator de crescimento insulina símile-1
IκB	Inibidor kappa B
IL-	Interleucina
IL-1ra	Antagonista do receptor de IL-1
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.m.	Intramuscular
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
kg	Quilograma
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
md	Mediana
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
MRP2	Proteína 2 associada a resistência multidroga

MTX	Metotrexato
NADPH	Dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Natural <i>Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPC	7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina
OPD	O-fenilenediamine diidrocloreto
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução tamponada de fosfato
pg	picograma
PG	Prostaglandina
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
P-gp	Glicoproteína P
PMN	Polimorfonucleares
PTX	Pentoxifilina
rhIL-11	IL-11 recombinante humano
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCFAs	Ácidos graxos de cadeia curta
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotecina
SN-38G	SN-38 glicuronídeo
s.c.	Subcutânea
TGF-	Fator de crescimento transformador
Th	T <i>helper</i>
TLD	Talidomida
TNF-	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
UDP-GT	Uridina difosfato glicuronosil-transferase
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
v.o.	Via oral

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	Estrutura química do cloridrato de irinotecano (CPT-11) lactona .....	22
FIGURA 2 –	Desenho esquemático do protocolo da mucosite intestinal experimental .....	51
FIGURA 3 –	Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na variação da massa corpórea de camundongos <i>Swiss</i> .....	61
FIGURA 4 –	Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) no leucograma de camundongos <i>Swiss</i> .....	62
FIGURA 5 –	Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na curva de sobrevivência de camundongos <i>Swiss</i> .....	63
FIGURA 6 –	Fotomicrografias da mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	66
FIGURA 7 –	Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na morfometria intestinal de camundongos <i>Swiss</i> .....	68
FIGURA 8 –	Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> .....	71
FIGURA 9 –	Efeito do cloridrato de irinotecano (CPT-11) nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> .....	72
FIGURA 10 –	Fotomicrografias da marcação de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	74
FIGURA 11 –	Fotomicrografias da marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	75

FIGURA 12 – Fotomicrografias da marcação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	76
FIGURA 13 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) na variação da massa corpórea em camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	80
FIGURA 14 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) no leucograma de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	81
FIGURA 15 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) na curva de sobrevivência de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	82
FIGURA 16 – Fotomicrografias da mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com pentoxifilina (PTX) .....	84
FIGURA 17 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) nas alterações morfológicas intestinais induzidas pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	86
FIGURA 18 – Efeito de diferentes doses de pentoxifilina (PTX) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	88
FIGURA 19 – Efeito da pentoxifilina (PTX) nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	89
FIGURA 20 – Fotomicrografias da marcação de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com pentoxifilina (PTX) .....	91

FIGURA 21 –	Fotomicrografias da marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com pentoxifilina (PTX) .....	92
FIGURA 22 –	Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na variação da massa corpórea em camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	95
FIGURA 23 –	Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) no leucograma de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	96
FIGURA 24 –	Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na curva de sobrevivência de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	97
FIGURA 25 –	Fotomicrografias do duodeno de camundongos <i>Swiss</i> normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com talidomida (TLD) .....	99
FIGURA 26 –	Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) nas alterações morfológicas intestinais induzidas pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	101
FIGURA 27 –	Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	104
FIGURA 28 –	Efeito da talidomida (TLD) nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	105
FIGURA 29 –	Fotomicrografias da marcação de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com talidomida (TLD) .....	107

FIGURA 30 –	Fotomicrografias da marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com talidomida (TLD) .....	108
FIGURA 31 –	Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) na variação da massa corpórea de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	111
FIGURA 32 –	Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) no leucograma de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	112
FIGURA 33 –	Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) na curva de sobrevida de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	113
FIGURA 34 –	Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) nas alterações morfológicas intestinais induzidas pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	116
FIGURA 35 –	Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	118
FIGURA 36 –	Fotomicrografias da marcação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com celecoxibe (CLX) .....	120
FIGURA 37 –	Modelo hipotético proposto para a cascata dos mediadores inflamatórios envolvidos na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	144

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na indução de diarreia em camundongos <i>Swiss</i> .....	60
TABELA 2 –	Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na indução de mucosite intestinal em camundongos <i>Swiss</i> .....	67
TABELA 3 –	Efeito do cloridrato de irinotecano (CPT-11) no grau de expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> .....	73
TABELA 4 –	Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) na severidade da diarreia induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	79
TABELA 5 –	Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) no grau de mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	85
TABELA 6 –	Efeito da pentoxifilina (PTX) no grau de expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	90
TABELA 7 –	Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na severidade da diarreia induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	94
TABELA 8 –	Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) no grau de mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	100
TABELA 9 –	Efeito da talidomida (TLD) no grau de expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	106

TABELA 10 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) na severidade da diarreia induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	110
TABELA 11 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) no grau de mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos <i>Swiss</i> .....	115
TABELA 12 – Efeito do celecoxibe (CLX) no grau de expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de camundongos <i>Swiss</i> com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) .....	119

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>1.1 Cloridrato de irinotecano (CPT-11)</b> .....	22
1.1.1 Estrutura química .....	22
1.1.2 Farmacocinética .....	23
1.1.3 Mecanismo de ação .....	24
1.1.4 Toxicidade .....	25
<b>1.2 Mucosite intestinal</b> .....	25
1.2.1 Fisiopatologia .....	25
1.2.2 Manifestações clínicas .....	29
1.2.3 Tratamento .....	30
<b>1.3 Mediadores inflamatórios envolvidos na mucosite intestinal</b> .....	33
1.3.1 Citocinas .....	33
1.3.2 Óxido nítrico (NO) .....	35
1.3.3 Prostaglandinas (PGs) .....	37
<b>1.4 Moduladores farmacológicos</b> .....	38
1.4.1 Pentoxifilina (PTX) .....	38
1.4.2 Talidomida (TLD) .....	40
1.4.3 Celecoxibe (CLX) .....	44
<b>1.5 Justificativa e objetivos</b> .....	46
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	48
<b>2.1 Animais de experimentação</b> .....	48
<b>2.2 Drogas, soluções, corantes e anticorpos</b> .....	48
<b>2.3 Modelo de indução da mucosite intestinal</b> .....	50
<b>2.4 Grupos experimentais</b> .....	52
2.4.1 Grupo normal .....	52
2.4.2 Grupo controle .....	52
2.4.3 Grupo tratado com PTX .....	52
2.4.4 Grupo tratado com TLD .....	53
2.4.5 Grupo tratado com CLX .....	53

<b>2.5 Parâmetros avaliados</b> .....	53
2.5.1 Avaliação da diarréia .....	53
2.5.2 Análise ponderal .....	53
2.5.3 Leucograma .....	54
2.5.4 Avaliação da sobrevida .....	54
2.5.5 Análise histopatológica e morfométrica .....	54
2.5.6 Atividade de mieloperoxidase (MPO) .....	55
2.5.7 Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno .....	55
2.5.8 Avaliação da expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) por imunohistoquímica .....	56
<b>2.6 Análise estatística</b> .....	57
<b>3 RESULTADOS</b> .....	58
<b>3.1 Modelo da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11</b> .....	58
3.1.1 Avaliação da diarréia induzida pelo CPT-11 .....	58
3.1.2 Efeito do CPT-11 na variação da massa corpórea .....	59
3.1.3 Efeito do CPT-11 no leucograma .....	59
3.1.4 Efeito do CPT-11 na sobrevida dos animais .....	59
3.1.5 Efeito do CPT-11 nas estruturas histológicas do intestino .....	64
3.1.6 Efeito do CPT-11 na atividade de MPO no duodeno.....	69
3.1.7 Efeito do CPT-11 nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno	69
3.1.8 Efeito do CPT-11 na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal .....	69
<b>3.2 Efeito do tratamento com PTX na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11</b> .....	77
3.2.1 Efeito da PTX na severidade da diarréia induzida pelo CPT-11 .....	77
3.2.2 Efeito da PTX na variação da massa corpórea de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	77
3.2.3 Efeito da PTX no leucograma de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	77
3.2.4 Efeito da PTX na sobrevida de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.....	78
3.2.5 Efeito da PTX nas estruturas histológicas do intestino de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	83

3.2.6 Efeito da PTX na atividade de MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	87
3.2.7 Efeito da PTX nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	87
3.2.8 Efeito da PTX na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	87
<b>3.3 Efeito do tratamento com TLD na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....</b>	<b>93</b>
3.3.1 Efeito da TLD na severidade da diarréia induzida pelo CPT-11 .....	93
3.3.2 Efeito da TLD na variação da massa corpórea de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	93
3.3.3 Efeito da TLD no leucograma de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	93
3.3.4 Efeito da TLD na sobrevivência de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	93
3.3.5 Efeito da TLD nas estruturas histológicas do intestino de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	98
3.3.6 Efeito da TLD na atividade de MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	102
3.3.7 Efeito da TLD nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	102
3.3.8 Efeito da TLD na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	102
<b>3.4 Efeito do tratamento com CLX na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....</b>	<b>109</b>
3.4.1 Efeito do CLX na severidade da diarréia induzida pelo CPT-11 .....	109
3.4.2 Efeito do CLX na variação da massa corpórea de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	109
3.4.3 Efeito do CLX no leucograma de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	109

3.4.4 Efeito do CLX na sobrevivência de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	109
3.4.5 Efeito do CLX nas estruturas histológicas do intestino de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	114
3.4.6 Efeito do CLX na atividade de MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	117
3.4.7 Efeito do CLX na expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 .....	117
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>121</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>144</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>145</b>
<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar do tratamento farmacológico do câncer ter tido um significativo avanço a partir de 1950, infelizmente, mais de 50% de todos os pacientes com câncer não respondem à terapia inicial e a doença progride para a doença metastática (CHU, 2005). Além disso, estes agentes farmacológicos não são específicos para as células tumorais e, portanto, atingem todas as células de divisão celular ativa. Deste modo, tanto as células malignas como os tecidos normais que possuem rápida proliferação estão sujeitos à ação destas drogas. Conseqüentemente, estas substâncias podem provocar efeitos tóxicos graves (RANG *et al.*, 2001; CALABRESI; CHABNER, 2003), sendo um dos órgãos afetados o trato gastrintestinal (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999).

Enquanto o manejo de diversas toxicidades relacionadas à quimioterapia, como a mielossupressão, náuseas e vômitos, tem evoluído, a incidência de mucosite tem aumentado. Os protocolos de tratamentos com altas doses de quimioterapia e esquemas terapêuticos que usam radioterapia e quimioterapia concomitante provavelmente tenham colaborado para este aumento. No entanto, pouco tem sido descoberto para prevenir e controlar a mucosite (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; CHU, 2005).

Segundo Rubenstein *et al.* (2004), a mucosite intestinal é observada entre 5-15% dos pacientes em protocolos padrão, e é descrita com uso de agentes como metotrexato (MTX) (GIBSON *et al.*, 2002a; GIBSON *et al.*, 2002b; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004), 5-fluorouracil (5-FU) (SONIS *et al.*, 2004a), ciclofosfamida (WOO *et al.*, 2000); gencitabina (APOSTOLIDOU *et al.*, 2003; MURAD *et al.*, 2003), capecitabina (BOEHMER; JAEGER, 2002; BORNER *et al.*, 2002) e cloridrato de irinotecano (CPT-11) (GIBSON *et al.*, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; ALIMONTI *et al.*, 2004).

No que tange ao CPT-11, a mucosite acompanhada de diarreia tem sido descrita na literatura como seu principal efeito tóxico (ABIGERGES *et al.*, 1995; BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; ALIMONTI *et al.*, 2004), e esta constitui o objeto de investigação da presente pesquisa.

### 1.1 Cloridrato de irinotecano (CPT-11)

O CPT-11 é um derivado semi-sintético da camptotecina. Esta substância foi inicialmente isolada nos Estados Unidos, por Wall *et al.*, em 1966, de uma planta nativa na China e no Tibet, *Camptotheca acuminata*. Apesar dos estudos desta época terem evidenciado seu potencial antineoplásico, sua comercialização só teve início na década de 1990, quando foi sintetizada uma molécula com menor toxicidade, o CPT-11 (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; ALIMONTI *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, o CPT-11 tem sido utilizado como agente único ou combinado com outros protocolos para tratamento de primeira e segunda linha para o câncer colorretal (SALTZ *et al.*, 2001; VAMVAKAS *et al.* 2002; ROSATI *et al.*, 2002; CHESTER *et al.*, 2003). Também tem sido utilizado no câncer de ovário (FUJII *et al.*, 2002), linfoma de Hodgkin's (RIBRAG *et al.*, 2003), pulmão (ROCHA-LIMA *et al.*, 2004a; LANGER, 2004), pâncreas (ROCHA-LIMA *et al.*, 2004b), mama (PEREZ *et al.*, 2004) e de estômago (AJANI, 2005; ENZINGER *et al.*, 2005).

### 1.1.1 Estrutura química

O CPT-11 é um sal triidratado, 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carboniloxi-camptotecina, que possui um anel ( $\alpha$ -hidroxi-3-lactona) que sofre hidrólise reversível no lúmen intestinal produzindo carboxilato e lactona (GUPTA *et al.*, 1997; DODDS *et al.*, 1998; IKEGAMI *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2006a). A estrutura química do CPT-11 na forma de lactona pode ser vista na Figura 1.

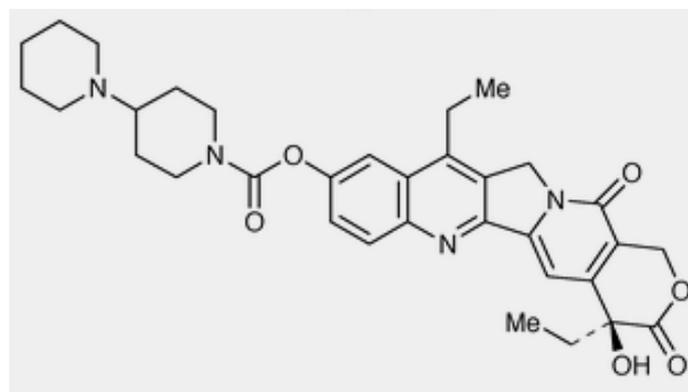


FIGURA 1 – Estrutura química do cloridrato de irinotecano (CPT-11) lactona.

Fonte: DODDS *et al.* (1998).

### 1.1.2 Farmacocinética

O CPT-11 é uma pró-droga convertida no seu metabólito ativo, SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina), pela enzima carboxilesterase (CE), particularmente hCE2. O SN-38 é 100 a 1.000 vezes mais ativo que o CPT-11 (RIVORY *et al.*, 1996; XIE *et al.*, 2002; CHESTER *et al.*, 2003). A CE encontra-se presente abundantemente no fígado e em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto. Esta enzima libera a cadeia lateral da dipiperidina presente na posição C-10 da molécula de irinotecano (ALIMONTI *et al.*, 2004).

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

O metabolismo da droga é principalmente hepático por uma enzima do sistema P450, particularmente CYP3A4, que gera componentes inativos como APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) (CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSSSEN *et al.*, 2004). Pequena parte de APC pode ser metabolizada pela CE em SN-38 (RIVORY *et al.*, 1996; MATHIJSSSEN *et al.*, 2004); já o NPC é metabolizado completamente em SN-38 por esta enzima, contribuindo na atividade e toxicidade do CPT-11 *in vivo* (RIVORY *et al.*, 1996; DODDS *et al.*, 1998; MATHIJSSSEN *et al.*, 2004).

Após o CPT-11 ser convertido em SN-38 nos tecidos, a detoxificação ocorre pela sua conjugação com a enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-GT) – UGT1A1, com a formação de SN-38 glicuronídeo (SN-38G), composto inativo (HAAZ *et al.*, 1997; CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSSSEN *et al.*, 2004). Gupta *et al.* (1997) observaram que a atividade da enzima UDP-GT pode ser modulada pelo ácido valpróico e fenobarbital. O primeiro provoca aumento da biodisponibilidade do SN-38, porque inibe glicuronidação, enquanto a administração do fenobarbital aumenta a reação de conjugação do SN-38, pois induz UDP-GT, podendo ser benéfico seu uso em pacientes com comprometimento da função hepática.

CPT-11 e SN-38 são transportados ligados às seguintes proteínas: glicoproteína P (P-gp), transportador canalicular multiespecífico de ânions orgânicos (cMOAT) e proteína 2 associada à resistência multidroga (MRP2) (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; TAKASUNA *et al.*, 2006).

A eliminação da droga é preferencialmente pelas fezes (60-70%), sendo também excretada pela bile (25%) e urina (10-20%) (ALIMONTI *et al.*, 2004). Quando SN-38G é eliminado pela bile no intestino, uma parte é excretada pelas fezes; outra parte pode ser re-transformada em SN-38 por bactérias intestinais produtoras de  $\beta$ -glicuronidase (como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*) (TAKASUNA *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2002). O uso de antibióticos como penicilina associado à estreptomicina (TAKASUNA *et al.*, 1998; TAKASUNA *et al.*, 2006), neomicina associado à bacitracina (TAKASUNA *et al.*, 2006) e cefalosporina (CHOWBAY *et al.*, 2003) reduz o acúmulo de SN-38 no intestino.

### 1.1.3 Mecanismo de ação

O CPT-11 e seu metabólito ativo (SN-38) são inibidores seletivos da topoisomerase I, uma enzima envolvida na replicação e transcrição do ácido desoxirribonucléico (DNA). As topoisomerasas mantêm a conformação tridimensional do DNA através da remoção dos espirais durante a replicação e transcrição, aliviando a tensão da torção produzida pelo enrolamento da molécula. A citotoxicidade deve-se ao dano no DNA durante fase S do ciclo celular, quando as enzimas de replicação do DNA colidem com um complexo ternário da droga, com o DNA e com a topoisomerase I. Este dano induzido pela droga não é corrigido de forma eficaz, provocando apoptose (TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; ALIMONTI *et al.*, 2004).

CPT-11 e SN-38 na forma de carboxilato são inibidores menos potente da topoisomerase I e têm atividade antitumoral mais fraca que a lactona. Entre as duas formas há um equilíbrio pH-dependente, sendo que o pH ácido promove formação de lactona e o pH básico resulta na forma aniônica do hidroxiácido (ARIMORI *et al.*, 2001; IKEGAMI *et al.*, 2002).

### 1.1.4 Toxicidade

As camptotecinas têm em geral menos efeitos adversos que a maioria dos agentes antineoplásicos (RANG *et al.*, 2001). Os efeitos tóxicos mais severos e que limitam o seu uso são a mielossupressão (principalmente neutropenia) e a diarreia tardia (SALIBA *et al.*, 1998; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; CHESTER *et al.*, 2003; ALIMONTI *et al.*, 2004). Outros efeitos adversos (grau 3 e 4) relatados são: náuseas e vômitos (9%), astenia (14%), alopecia (53%), elevação das transaminases hepáticas (8%) e anemia (9%) (ABIGERGES *et al.*, 1995).

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

Dois tipos de diarreia são associados com o uso do CPT-11: diarreia aguda ou precoce e diarreia crônica ou tardia (RUBEINSTEIN *et al.*, 2004). O primeiro tipo, de curso geralmente leve, ocorre durante ou logo após administração da droga pelo aumento da atividade colinérgica, pois o CPT-11 inibe acetilcolinesterase (AChE) (GANDIA *et al.*, 1993; DODDS *et al.*, 1999; DODDS; RIVORY, 1999; DODDS *et al.*, 2001). O segundo, de início tardio, possui alta incidência, em torno de 82% (SALIBA *et al.*, 1998), e, quando grave, pode limitar a eficácia do tratamento, já que muitas vezes é necessário reduzir sua dose ou até mesmo suspender a administração da droga (ABIGERGES *et al.*, 1994; IKEGAMI *et al.*, 2002; DUNCAN; GRANT, 2003; ALIMONTI *et al.*, 2004).

## **1.2 Mucosite intestinal**

### **1.2.1 Fisiopatologia**

Mucosite alimentar é um termo que descreve a inflamação, erosão e lesões ulcerativas no trato alimentar secundário à quimioterapia e/ou radioterapia do câncer (LALLA *et al.*, 2006). A incidência é alta no transplante de medula óssea, terapia contínua para câncer de mama e cólon e na terapia de tumores de cabeça e pescoço. Nos protocolos de alto risco, a mucosite severa ocorre em mais de 60% dos casos (RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

Os mecanismos fisiopatológicos e o papel dos mediadores inflamatórios no curso da mucosite oral são bem estabelecidos, entretanto, ainda não é bem esclarecida a patogênese da mucosite intestinal (DUNCAN; GRANT, 2003; GIBSON; KEEFE, 2006). Publicações recentes de Keefe (2004) e Bowen *et al.* (2006) afirmam que a patobiologia da mucosite intestinal é um processo tão complexo quanto o proposto para a mucosite oral. Por este motivo, atualmente tem sido proposto o termo mucosite alimentar que abrange tanto a mucosite oral como a intestinal (KEEFE, 2004; KEEFE, 2006; BOWEN *et al.*, 2006; PETERSON *et al.*, 2006).

A mucosite induzida por agentes quimioterápicos ou radioterapia é causada por danos nas células epiteliais com subsequente indução local da resposta inflamatória (SONIS *et al.*, 2004a; SONIS, 2004; KEEFE, 2004). Na literatura são descritos alguns fatores de risco que predisõem os pacientes à mucosite intestinal, tais como: comprometimento do estado imunológico, altos níveis endógenos de citocinas pró-inflamatórias, má condição nutricional, composição da flora intestinal (DUNCAN; GRANT, 2003; AVRITSCHER *et al.*, 2004).

A elevada taxa de proliferação celular no intestino explica o fato destas células serem afetadas por drogas utilizadas na quimioterapia do câncer. Ocorre destruição das células de divisão presentes nas criptas, responsáveis pela renovação epitelial dos vilos (KEEFE *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2002a; GIBSON *et al.*, 2002b; XIAN, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBENSTEIN *et al.*, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; GIBSON; KEEFE, 2006). Assim, as células epiteliais continuam a ser descamadas no topo dos vilos e as drogas inibem a proliferação celular, o que promove atrofia do epitélio, provocando alterações histológicas que incluem atrofia da mucosa, com consequente inflamação, lesão e ulceração (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

Duncan e Grant (2003), em trabalho de revisão, descrevem os mecanismos da mucosite intestinal em quatro fases: período inicial, restituição, inflamação, recuperação.

A fase inicial caracteriza-se pela ação das drogas quimioterápicas que bloqueiam a síntese do DNA por inibição da topoisomerase e síntese do timidilato. Pode também ocorrer alterações na molécula do ácido ribonucléico (RNA) e formação de radicais livres. Desse modo, as células progenitoras de divisão rápida presentes nas criptas são afetadas. Todas estas alterações inibem o processo mitótico, provocando ruptura dos processos celulares e de interações célula

substrato, que afetam a integridade celular e provocam o estímulo para o influxo de células inflamatórias e imunes da lâmina própria (DUNCAN; GRANT, 2003).

Durante a segunda fase ocorre paralisação da divisão celular por algumas horas e apoptose. Isto induz a perda progressiva de células nas criptas e ativa os processos de restituição. Nesta etapa há um colapso na profundidade e no número de criptas, encurtamento dos vilos e depleção de células caliciformes (XIAN *et al.*, 1999; KEEFE *et al.*, 2000). A inflamação ocorre em terapia agressiva e é caracterizada por perda celular juntamente com um processo de restituição contínuo, levando a uma completa perda da superfície absorviva e da integridade da barreira. Esta fase caracteriza-se por perdas de fluidos e colonização bacteriana (DUNCAN; GRANT, 2003).

E por fim, no processo de recuperação ocorre uma significativa proliferação celular ao redor de três a quatro dias após o término da terapia, que leva a restauração funcional das criptas, bem como seu aumento. Conseqüentemente, ocorre uma recuperação na estrutura e função dos vilos, com retorno da superfície absorviva do intestino por volta de uma semana (XIAN *et al.*, 1999; DUNCAN; GRANT, 2003).

Segundo Keefe *et al.* (2000), a quimioterapia do câncer causa apoptose que precede a hipoplasia das criptas no intestino delgado de humanos. A primeira anormalidade notada no primeiro dia após o tratamento quimioterápico é o aumento de apoptose, seguindo-se da redução das criptas, da área dos vilos e do índice mitótico a partir do terceiro dia. A hiperplasia das criptas se inicia no quinto dia e ocorre antes da normalização da mucosa intestinal.

As modificações que as células sofrem quando morrem por apoptose são decorrentes da ativação de certas proteases citossólicas chamadas caspases (BOWEN *et al.*, 2006). O controle da apoptose depende da expressão dos genes apoptóticos e antiapoptóticos da família Bcl-2 (THORNBERRY, 1998; KEEFE, 2004; KEEFE *et al.*, 2004; KEEFE, 2006; BOWEN *et al.*, 2006). Sabe-se, hoje, que a quimioterapia do câncer aumenta a expressão de fatores apoptóticos da proteína Bcl-2 (KEEFE, 2004; BOWEN *et al.*, 2006).

O intestino delgado é predominantemente o local de maior destruição induzida por drogas quimioterápicas (KEEFE, 2006; BOWEN *et al.*, 2006). Apesar do tratamento com MTX e CPT-11 provocar destruição também no cólon, as alterações são consideravelmente menores (GIBSON *et al.*, 2003). Postula-se que a mucosite é

usualmente mais proeminente no intestino delgado pela diferença na expressão de fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos da proteína Bcl-2 em diferentes regiões intestinais (KEEFE *et al.*, 2004). Além disso, as células do intestino delgado apresentam *turnover* maior que as do intestino grosso (BOWEN *et al.*, 2006).

Outros estudos apontam que a relação entre apoptose e proliferação intestinal depende da expressão dos fatores de transcrição p53 e p21 (KEEFE *et al.*, 2004; GIBSON *et al.*, 2005; BOWEN *et al.*, 2006). Pritchard *et al.* (1998) mostraram que p53 é responsável pela destruição de criptas decorrente do tratamento com 5-FU. Observou-se que camundongos geneticamente manipulados – *knockout* (p53<sup>-/-</sup>) tratados com 5-FU, tiveram menor resposta apoptótica que camundongos normais (p53<sup>+/+</sup>). Posteriormente, Gibson *et al.* (2005) observaram que o uso de MTX (5 mg/kg) induziu aumento da atividade apoptótica, destruição severa das criptas e aumento da expressão de p53 sem aumento da expressão de p21.

Os fatores de transcrição, destacando-se o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), possuem um papel-chave no desenvolvimento da mucosite oral, pois modificam a expressão de citocinas e enzimas (SONIS, 2002; SONIS, 2004; SONIS *et al.*, 2004a). Na patogênese da mucosite intestinal, Yeoh *et al.* (2005) referem seu aumento de expressão acompanhando as alterações no tecido colorretal após tratamento radioterápico em seres humanos. A radiação ativa e aumenta a expressão de NF-κB, que ativa as proteínas como a ciclooxigenase-2 (COX-2). Bowen *et al.* (2007) identificaram que a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) também sinaliza a destruição intestinal induzida por CPT-11 e que o aumento de expressão das caspases 1 e 3 é responsável pelo processo de apoptose.

As citocinas, o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas (PGs), por possuírem um papel de grande relevância na regulação do processo inflamatório, têm se mostrado como fortes candidatas a serem agentes endógenos liberados em resposta a agentes quimioterápicos (KASE *et al.*, 1997; WILLIAMS, 2001; TRIFAN *et al.*, 2002; DE KONING *et al.*, 2006; LEITÃO *et al.*, 2007). Sabe-se que estes mediadores estão implicados na patogenia da mucosite oral, entretanto, o processo de ativação dos componentes pró-inflamatórios e os mecanismos desencadeados pela mucosite intestinal ainda não estão bem esclarecidos.

### 1.2.2 Manifestações clínicas

A mucosite manifesta-se clinicamente pelo aparecimento de sintomas gastrintestinais como distensão abdominal, dor abdominal e diarreia, as quais podem levar à desidratação e à má-absorção de nutrientes (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBENSTEIN *et al.*, 2004; AVRITSCHER *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006).

A diarreia caracteriza-se pelo aumento da frequência das evacuações e redução da consistência das fezes, que pode ou não ser acompanhada de sangue e cólicas (SALTZ, 2003; GIBSON; KEEFE, 2006). Para medir a severidade da diarreia induzida por quimioterápicos, o *National Cancer Institute* (NCI, 2006) recomenda os seguintes escores: 0 – ausência de diarreia; 1 – aumento menor que quatro evacuações por dia em relação ao pré-tratamento; 2 – aumento de quatro a seis evacuações por dia ou diarreia noturna, presença de cólicas moderadas; 3 – aumento de sete a nove evacuações por dia ou incontinência, presença de cólicas severas; 4 – aumento de dez evacuações, ou mais por dia ou visualização macroscópica de sangue nas fezes ou necessidade de suporte parenteral.

A ação da quimioterapia na fisiologia e estrutura do trato gastrintestinal contribui para anorexia, diminuição do consumo de alimentos e redução da absorção de nutrientes, que induzem à desnutrição e caquexia (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; DUNCAN; GRANT, 2003; AVRITSCHER *et al.*, 2004; SONIS, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006), manifestada clinicamente por perda tecidual, atrofia da musculatura esquelética, miopatia, perda rápida de tecido gorduroso, atrofia de órgãos viscerais e anergia (MATTOX, 2005). Esta condição reduz a qualidade de vida dos pacientes e aumenta a sua morbidade (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; RUBENSTEIN *et al.*, 2004). Algumas vezes no tratamento da mucosite é necessária hospitalização, uso de medicamentos e nutrição parenteral total, com conseqüente aumento de custo (SONIS *et al.*, 2004a), podendo ainda provocar atraso ou redução da administração do tratamento quimioterápico (RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

Além disso, a mucosite quando associada à neutropenia pela mielossupressão é um fator de risco para septicemia (SONIS, 2004; AVRITSCHER *et al.*, 2004). A resposta inflamatória desencadeada pode ser agravada por infecções secundárias, que poderão levar à translocação bacteriana e à septicemia (WOO *et al.*, 2000), podendo também aparecer obstrução intestinal, perfuração e formação de fístulas (RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Tratamento

Apesar dos grandes avanços no conhecimento da mucosite intestinal, não existe um protocolo definitivo para a prevenção e tratamento destas lesões (GIBSON *et al.*, 2002a e 2002b; SALTZ, 2003; GIBSON; KEEFE, 2006). Comitês de estudo da mucosite (*Multinational Association of Supportive Care in Cancer – MASCC; International Society for Oral Oncology – ISOO*) elaboraram um guia prático para a prevenção e tratamento da mucosite oral e gastrintestinal. Neste painel recomenda-se o tratamento da diarreia com loperamida, um agente que reduz a peristalse, aumenta o tempo de trânsito intestinal e promove a reabsorção de água (RUBENSTEIN *et al.*, 2004; KEEFE *et al.*, 2007).

Lenfers *et al.* (1999) recomendam a budesonida, um corticosteróide, quando houver falha no tratamento com o uso da loperamida e também para ser utilizado profilaticamente no controle da diarreia induzida pelo CPT-11 e 5-FU. Entretanto, a maioria dos estudos indica o uso de octreotida quando não houver melhora da diarreia com loperamida (ZIDAN *et al.*, 2001; RUBENSTEIN *et al.*, 2004; PETERSON *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006; KEEFE *et al.*, 2007). A octreotida é um análogo da somatostatina, que inibe hormônios gastrintestinais e regula o transporte de água e eletrólitos na mucosa intestinal (ZIDAN *et al.*, 2001).

Existem outros agentes sendo investigados como substâncias com potencial de prevenir e tratar a mucosite intestinal como a glutamina, fatores de crescimento e citocinas antiinflamatórias (PETERSON *et al.*, 2004; BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006).

Sabe-se que a glutamina é um precursor essencial para a síntese de purinas e pirimidinas, é a fonte energética preferencial para os enterócitos e ativa a proliferação celular, ampliando o estímulo de fatores de crescimento como o fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento insulina símile-1 (IGF-1) (PALANCH, 2000). Alguns autores defendem que a glutamina melhora a barreira intestinal e estimula o crescimento dos vilos após a quimioterapia (KLIMBERG *et al.*, 1990; PALANCH, 2000; PETERSON *et al.*, 2004; HARSHA *et al.*, 2006). Apesar de achados positivos do efeito da glutamina na mucosite intestinal experimental (KLIMBERG *et al.*, 1990; HARSHA *et al.*, 2006), em estudo clínico com 5-FU não se observou efeito benéfico com o uso deste aminoácido (OKUNO *et al.*, 1999).

Entretanto, Savarese *et al.* (2000) descreveram que a suplementação oral de glutamina preveniu clinicamente a diarreia tardia decorrente do tratamento com CPT-11. O último consenso publicado pela seção de mucosite da MASCC e ISOO não recomenda o uso de glutamina para a prevenção da mucosite intestinal (KEEFE *et al.*, 2007).

No que se refere aos fatores de crescimento, em modelos animais, observou-se aumento na expressão do fator de crescimento do hepatócito (HGF) no período de hiperproliferação das criptas, sugerindo seu papel positivo no processo de reparo (XIAN *et al.*, 2000). Do mesmo modo, IGF-1 atenuou a mucosite induzida por MTX (HOWARTH, 2003) e 5-FU (COOL *et al.*, 2005), por promover a proliferação intestinal, acelerando o reparo epitelial.

Van't Land *et al.* (2004) observaram que a suplementação oral de lactoferrina protegeu ratos da mucosite intestinal induzida por MTX, por inibição da proliferação de células epiteliais, via bloqueio de peptídeo glucagon símile (GLP-2). Segundo o autor, uma parada temporal do *turnover* das células epiteliais protege da destruição induzida por quimioterápicos.

A administração do fator de crescimento de queratinócitos (KGF), que possui ação trófica nas células epiteliais, não protegeu o intestino delgado das alterações morfológicas (área dos vilos, tamanho das criptas e índice mitótico) induzidas pelo MTX, apesar de proteger o intestino da redução de peso provocada por este agente antitumoral (GIBSON *et al.*, 2002a). Huang *et al.* (2002) também não encontraram evidências de que o EGF teria um papel preventivo e indutor no reparo da destruição intestinal provocada por 5-FU. Por outro lado, experimentalmente, uma dieta rica em glutamina, fator de crescimento transformador-beta (TGF- $\beta$ ) e ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), ingerida antes e durante o tratamento com MTX, protegeu ratos da perda de peso, hipoalbuminemia e das lesões gastrintestinais induzidas pela droga (HARSHA *et al.*, 2006).

Outros estudos observaram a ação protetora da interleucina-11 (IL-11), uma citocina antiinflamatória. Especula-se que IL-11 pode reduzir a ativação de citocinas. Na mucosite oral, Sonis *et al.* (2000) demonstraram que o tratamento com

IL-11 recombinante humano (rhIL-11) foi efetivo para atenuar a mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters, pela sua habilidade em reduzir a expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e da interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ). A administração de IL-11 teve também efeito positivo na mucosite intestinal induzida pelo MTX, reduzindo a perda de peso e melhorando a morfometria intestinal. Entretanto, IL-11 não preveniu apoptose das criptas induzida pela quimioterapia (GIBSON *et al.*, 2002b).

Outras estratégias têm sido propostas para terapia da diarreia induzida pelo CPT-11. Alguns estudos apontam o efeito protetor dos antibióticos na toxicidade intestinal induzida pelo CPT-11, por estes reduzirem a exposição do intestino grosso ao SN-38 por inibição do desenvolvimento das bactérias produtoras de  $\beta$ -glicuronidase (GUPTA *et al.*, 1997; TAKASUNA *et al.*, 1998; CHOWBAY *et al.*, 2003; TAKASUNA *et al.*, 2006). Chowbay *et al.* (2003) também testaram em ratos a administração por via oral (v.o.) de carvão mineral na tentativa de reduzir absorção intestinal do CPT-11, SN-38 e SN-38G, e não observaram efeito no controle da diarreia. Em modelo experimental (IKEGAMI *et al.*, 2002) e em estudo clínico (TAMURA *et al.*, 2004), a alcalinização do trato intestinal, através da administração de bicarbonato de sódio, preveniu a diarreia, provavelmente por reduzir a concentração de CPT-11 e SN-38 na forma lactona (IKEGAMI *et al.*, 2002).

A administração de IL-15 (11 doses de 100 ou 400  $\mu$ g/kg), em ratos, reduziu a destruição da mucosa intestinal induzida pelo CPT-11, a incidência de diarreia e a letalidade dos animais. As duas doses foram efetivas, apesar de melhor resposta ser observada com a menor dose. Este efeito positivo parece ser pelo fato de IL-15 inibir a apoptose celular e/ou estimular o crescimento de células no epitélio intestinal. Esta citocina também pode melhorar a imunidade, reduzindo a ação das bactérias intestinais e reduzindo a mielossupressão induzida pelo CPT-11 (CAO *et al.*, 1998).

Experimentalmente, observou-se que a co-administração de *St. John's wort* ou erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*) melhorou a toxicidade intestinal induzida pelo CPT-11, pela sua capacidade de inibir citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  (HU *et al.*, 2006).

Conclui-se, pois, que os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese da mucosite intestinal ainda não são totalmente esclarecidos. Além disso, o seu tratamento consiste apenas em uma abordagem essencialmente

paliativa, não existindo um protocolo de atendimento eficaz. Entretanto, torna-se cada vez mais evidente a participação de mediadores inflamatórios na infiltração celular, lesão tecidual, ulceração, secreção e cicatrização intestinal (SARTOR, 1994; SAKAI *et al.*, 1995 e 1997; WILSON; GIBSON, 1997; BARRACHINA *et al.*, 2001; DE KONING *et al.*, 2006; BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006). Considerando estes aspectos, o conhecimento dos mecanismos específicos do processo inflamatório que induz às lesões teciduais abre novas perspectivas na utilização de agentes moduladores da resposta inflamatória para o tratamento e prevenção da mucosite intestinal. A seguir, serão abordados os mediadores inflamatórios e os agentes farmacológicos que serão avaliados na presente pesquisa.

### **1.3 Mediadores inflamatórios envolvidos na mucosite intestinal**

#### **1.3.1 Citocinas**

As citocinas compreendem um amplo grupo de glicoproteínas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de modular a atividade celular em condições fisiológicas e patológicas. Podem ser sintetizadas por todas as células nucleadas do corpo, mas são liberadas principalmente por macrófagos e linfócitos. A maioria delas age localmente, de forma autócrina, ou seja, atuam sobre os receptores das próprias células que as produzem; e de forma parácrina, atuam em células-alvo vizinhas ou distantes (SARTOR, 1994; NICOLA, 1994).

Em geral, as citocinas são pleiotrópicas, isto é, têm múltiplos efeitos, uma única citocina pode interagir com mais de um tipo de célula, ter muitas atividades biológicas, interagir com outras citocinas com atividades sinérgicas ou antagônicas. Estas ações incluem numerosos efeitos nas células do sistema imune e modulação da resposta inflamatória. A produção constitutiva das citocinas é normalmente baixa ou ausente, a sua síntese é regulada por vários estímulos indutores em nível de transcrição (NICOLA, 1994).

A exposição do intestino a determinadas citocinas reproduz a inflamação intestinal, induzindo a migração de macrófagos, linfócitos e eosinófilos da lâmina própria para a superfície do epitélio. Estas células representam uma importante

defesa contra microrganismos luminais e facilitam o processo de reparo por aumento no processo de restituição (SARTOR, 1994; WILSON; GIBSON, 1997; MAHIDA *et al.*, 1997; WILLIAMS, 2001; DE KONING *et al.*, 2006).

Segundo Williams (2001), citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-2; e antiinflamatórias, antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra), TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-11 estão envolvidas na lesão e reparo da mucosa. Wilson; Gibson (1997) destacam no processo inflamatório intestinal a importância da IL-8, IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ . No entanto, segundo o mesmo autor, IL-4 e IL-10 podem perpetuar a injúria epitelial por inibir a migração celular. No presente trabalho, será especulado o papel de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e quimiocina derivada de queratinócitos (KC).

O TNF é expresso em duas formas: TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ . TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos, células natural *Killer* e mastócitos, enquanto TNF- $\beta$  é primariamente um produto de linfócitos T ativados. São atividades bem definidas destas citocinas, a habilidade de ativar neutrófilos, estimular a produção de IL-1, inibir a atividade da lipoproteína lípase, induzir a caquexia e choque séptico (PALLADINO Jr.; FINKLE, 1986; FONG; LOWRY, 1990). O TNF- $\alpha$  tem sido apontado como um dos mediadores inflamatórios implicados nas alterações da fisiologia intestinal por induzir expansão na população de células residentes da lâmina própria e epitélio intestinal, com conseqüente liberação de citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8; e também de derivados lipídicos, enzimas, oxidantes, capazes de provocar secreção e lesão na mucosa intestinal (McKAY; PERDUE, 1993; SARTOR, 1994).

Existem duas formas de IL-1, a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que possuem atividades biológicas semelhantes e se ligam com a mesma afinidade aos receptores de membrana. Existe um terceiro membro na família de genes IL-1, o IL-1ra, que inibe as ações inflamatórias de IL-1, porque compete biologicamente pela ligação com receptores de IL-1 (AREND, 1991). IL-1 possui influência marcante no desenvolvimento de lesões e na secreção intestinal por estimular a síntese de PGs (THEODOROU *et al.*, 1994) e IL-8 (SARTOR, 1994). *In vitro*, demonstrou-se que o efeito secretório intestinal do sobrenadante de macrófagos estimulados pela toxina A foi dependente da atividade de IL-1 $\beta$  (ROCHA *et al.*, 1998).

A KC é o homólogo de IL-8 em camundongos, que pertence a uma família de pequenas proteínas estruturalmente semelhantes, as quimiocinas, consideradas uma sub-família das citocinas. É bem estabelecido que citocinas pró-inflamatórias

como TNF- $\alpha$  e IL-1 são indutores da síntese de IL-8, um poderoso ativador de neutrófilos (LARSEN *et al.*, 1989; MARTICH *et al.*, 1991; THOMAZZI *et al.*, 1997). Demonstrou-se experimentalmente que IL-8 induz a inflamação intestinal, caracterizada pela ativação de células imunes, endoteliais e epiteliais, e pelo recrutamento de células inflamatórias circulantes (SARTOR, 1994).

### 1.3.2 Óxido nítrico (NO)

Furchogott e Zawadzki, em 1980, demonstraram que o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina foi dependente da presença do endotélio e evidenciaram que este efeito foi mediado por um fator, posteriormente conhecido como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF). Em 1987, demonstrou-se que o EDRF era o NO (CLANCY *et al.*, 1998). Atualmente, sabe-se que o NO é produzido por várias células e que, além de regular a vasodilatação, desempenha outros papéis relevantes como na transmissão de estímulos nervosos, na fisiologia pulmonar, na coagulação sangüínea e na resposta inflamatória (MONCADA *et al.*, 1997; CLANCY *et al.*, 1998).

O NO é uma pequena molécula composta de um átomo de nitrogênio e oxigênio, apresentando um elétron desemparelhado, o que o torna altamente reativo. Possui meia-vida curta, menor que 15 segundos. E, após transmitir um sinal transforma-se espontaneamente em nitrito e nitrato (CLANCY *et al.*, 1998; KENDALL *et al.*, 2001).

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) é responsável pela síntese de NO a partir do substrato L-arginina. Três isoformas de NOS são descritas, sendo uma NOS induzida (iNOS) expressa em resposta a estímulos patológicos, e duas NOS constitutivas (cNOS), que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio e neurônios. As enzimas constitutivas são responsáveis pela síntese de pequenas quantidades de NO, enquanto a atividade da iNOS é, aproximadamente, mil vezes maior (MONCADA *et al.*, 1997; CLANCY *et al.*, 1998).

A atividade das formas constitutivas é regulada principalmente pela concentração de cálcio intracelular. O NO produzido por essa enzima atua como mecanismo de transdução. Os efeitos fisiológicos das baixas concentrações de NO produzidas em condições normais pela cNOS são mediados pelo monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). O NO é o ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel,

levando a formação de cGMP, que atua como segundo mensageiro em muitas células. Entretanto, os efeitos citotóxicos e citoprotetores de altas concentrações de NO relacionam-se com sua atividade como radical livre (MONCADA *et al.*, 1997).

A expressão de iNOS é resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa, resultante de uma lesão ou dano tecidual e é regulada à nível transcricional (MONCADA *et al.*, 1997; KENDALL *et al.*, 2001). Tem sido demonstrado na literatura que as citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (CLANCY *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 2002; KENDALL *et al.*, 2001) e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (BARRACHINA *et al.*, 2001; KENDALL *et al.*, 2001) estimulam a expressão da enzima com conseqüente produção de NO. Por outro lado, a indução de iNOS pode ser suprimida por citocinas antiinflamatórias, tais como IL-4 e IL-10, e por glicocorticóides (CLANCY *et al.*, 1998; KENDALL *et al.*, 2001).

O NO é um potente vasodilatador e seu envolvimento na resposta inflamatória pode estar relacionado com sua habilidade de aumentar a permeabilidade vascular e o edema através de alterações no fluxo sanguíneo local e do aumento na produção de PGs (KENDALL *et al.*, 2001). Além disso, o NO produzido pela iNOS atua como uma molécula citotóxica contra microrganismos invasores e células tumorais. A ação citostática e citotóxica do NO se deve a sua atividade inibidora de enzimas na cadeia respiratória e na síntese de DNA. O NO interage com ânions superóxidos produzindo substâncias tóxicas como o peroxinitrito. Embora o NO seja importante para a defesa e na manutenção da homeostase, a sua produção excessiva pode causar danos teciduais ao hospedeiro e pode estar envolvido na patogênese de condições como o choque séptico (MONCADA *et al.*, 1997; KENDALL *et al.*, 2001). É extensivamente mostrado na literatura que o NO derivado da iNOS é mediador de doenças inflamatórias, incluindo cistite hemorrágica (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2002), pancreatite (GÓMEZ-CAMBRONERO *et al.*, 2000) e mucosite oral (LEITÃO *et al.*, 2007).

No trato gastrintestinal estão presentes as isoformas constitutiva e induzida. O NO tem um papel estimulante da migração epitelial (WILSON; GIBSON, 1997; KUBES; McCAFFERTY, 2000; DIJKSTRA *et al.*, 2004). O NO na forma constitutiva mantém intacta a barreira da mucosa, pelo seu efeito antioxidante, pela sua capacidade de reduzir a infiltração de neutrófilos e inibir a enzima dinucleotídeo fosfato de nicotinamida adenina (NADPH) oxidase. Portanto, a inibição da enzima NOSc aumenta o estresse oxidativo e a permeabilidade intestinal (KUBES E

MCCAFFERTY, 2000; POTOKA *et al.*, 2002). Por outro lado, a presença de iNOS contribui para inflamação intestinal, induz apoptose e estimula a secreção intestinal (KUBES; McCAFFERTY, 2000; BARRACHINA *et al.*, 2001; POTOKA *et al.*, 2002; DIJKSTRA *et al.*, 2004) e parece ser importante na evolução da translocação bacteriana (POTOKA *et al.*, 2002). Assim, o manejo da atividade desta enzima pode ser uma opção para o tratamento de condições inflamatórias do intestino (DIJKSTRA *et al.*, 2004).

### 1.3.3 Prostaglandinas (PGs)

Os eicosanóides estão envolvidos no controle de vários processos fisiológicos e estão entre os mais importantes mediadores da resposta inflamatória (VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002; VANE; BOTTING, 2003).

A síntese dos eicosanóides pode ser desencadeada por diversos estímulos que ativam receptores de membrana acoplados à proteína G, resultando na ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, a qual hidrolisa fosfolípidos de membrana liberando ácido araquidônico (AA). O AA é substrato para duas vias enzimáticas: a via das COXs, que induz a síntese de PGs e dos tromboxanos (TXs), e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos e lipoxinas (VANE *et al.*, 1990; VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002; VANE; BOTTING, 2003).

A COX, isolada em 1976 e clonada em 1988, é a enzima-chave que cataliza duas etapas na síntese das PGs. As COXs possuem duas atividades distintas, uma de endoperóxido redutase que oxida o AA em PGG<sub>2</sub>; e outra que reduz PGG<sub>2</sub> em PGH<sub>2</sub>. PGH<sub>2</sub> é então transformado por outras enzimas em PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (VANE *et al.*, 1990; VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002; VANE; BOTTING, 2003).

Sabe-se, atualmente, que dois genes expressam duas isoformas distintas bastante similares da enzima, COX-1 e COX-2, que possuem a estrutura primária protéica similar e catalisam a mesma reação (VANE *et al.*, 1998; VANE; BOTTING, 2003). A COX-1 é expressa constitutivamente, ou seja, estar presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, trato gastrointestinal e rins. A COX-2, com expressão predominantemente no processo inflamatório, é induzida na presença de citocinas (IL-1, IL-2, TNF-α), fatores de crescimento e endotoxinas (VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002). As citocinas

antiinflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13 e os corticosteróides reduzem a indução de COX-2 (ONOE *et al.*, 1996; VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002). Atualmente, sabe-se que COX-2 também é expressa em pequenas quantidades constitutivamente (VANE *et al.*, 1998).

Recentemente, foi descrita uma terceira isoenzima de COX, a COX-3; e duas proteínas derivadas de COX-1, denominadas proteínas COX-1 parcial (PCOX-1). A COX-3 e uma das proteínas parciais da COX-1, PCOX-1a, são obtidas a partir do gene de COX-1. COX-3 compartilha todas as características catalíticas e estruturais tanto de COX-1 como de COX-2 (WILLOUGHBY *et al.*, 2000; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Sabe-se que PGs desempenham um papel relevante na fisiopatologia das diarreias inflamatórias. Os eicosanóides são ativados durante a inflamação intestinal pela COX-2 (TAN *et al.*, 2000; STURM; DIGNASS, 2002). Trabalhos *in vitro* relatam o papel deste mediador no estímulo à secreção de cloro e água no intestino (SAKAI *et al.*, 1995 e 1997; SUZUKI *et al.*, 2000). Por outro lado, as PGs também são importantes nos mecanismos de reparo intestinal (TAN *et al.*, 2000).

## **1.4 Moduladores farmacológicos**

### **1.4.1 Pentoxifilina (PTX)**

A pentoxifilina (PTX / 1-[5-oxohexil]-3,7-dimetilxantina), inicialmente descrita como agente hemorreológico, possui efeito hemodinâmico primário devido a sua capacidade de reduzir a viscosidade do sangue e aumentar a deformabilidade dos eritrócitos. A redução da viscosidade do sangue e do plasma ocorre pela redução da agregação plaquetária e das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, o que diminui o potencial de formação de trombos, melhorando a perfusão na circulação microvascular. A PTX exerce estes efeitos farmacológicos por inibir a fosfodiesterase, aumentando desta forma as concentrações intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), bem como por reduzir a síntese do TXA<sub>2</sub> e aumentar a síntese de PGI<sub>2</sub>. Já o aumento da deformabilidade dos eritrócitos envolve

aumento do trifosfato de adenosina (ATP) e nucleotídeos nos eritrócitos (WARD; CLISSOLD, 1987).

A droga é rapidamente metabolizada por redução, formando o metabólito ativo 1-(-5-hidroxihexil)-3,7-dimetilxantina (metabólito 1); e por oxidação a outros metabólitos, especialmente metabólito 4 e 5. O fármaco na forma inicial e o metabólito ativo ligam-se à membrana dos eritrócitos. A principal via de excreção é a renal sob a forma de metabólitos polares hidrossolúveis (WARD; CLISSOLD, 1987).

A PTX tem sido utilizada em doenças oclusivas arteriais periféricas e distúrbios de natureza aterosclerótica ou diabética, como claudicação intermitente e úlceras nas pernas e gangrena, alterações circulatórias cerebrais, estados isquêmicos e pós-apopléticos (WARD; CLISSOLD, 1987; BOMBINI *et al.*, 2004).

Novos usos da PTX estão sendo pesquisados e se relacionam ao seu efeito antiinflamatório, por afetar a aderência de neutrófilos, a produção de citocinas (GÓMEZ-CAMBRONERO *et al.*, 2000; CARNEIRO FILHO *et al.*, 2001; ABDEL-SALAM *et al.*, 2003; BOMBINI *et al.*, 2004; LIMA, 2004; LIMA *et al.* 2005), óxido nítrico (BESHAY *et al.*, 2001) e a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) (FUNK *et al.*, 1995). Assim, a PTX e seus metabólitos modulam a adesão de leucócitos polimorfonucleares (PMN), a produção de superóxidos e a desgranulação (SULLIVAN *et al.*, 1988). Devido ao seu potencial imunomodulador, a PTX tem sido alvo de pesquisas para o tratamento de doenças inflamatórias (GÓMEZ-CAMBRONERO *et al.*, 2000; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2001), da perda de peso dos pacientes com câncer (MATTOX, 2005) e câncer (MISIRLIOGLU *et al.*, 2006).

Vários estudos têm comprovado que a PTX reduz os níveis de TNF- $\alpha$  (SULLIVAN *et al.*, 1988; STRIETER *et al.*, 1988; NEUNER *et al.*, 1994; FUNK *et al.*, 1995; HUIZINGA *et al.*, 1996; SCHMIDT-CHOUDHURY *et al.*, 1996; VAN FURTH *et al.*, 1997; REIMUND *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000; HADDAD *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2004), por inibir a transcrição do seu gene (DOHERTY *et al.*, 1991) pelo aumento da geração intracelular de cAMP (STRIETER *et al.*, 1988; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000). *In vitro*, a inibição de TNF- $\alpha$ , em parte suprime a síntese de IL-2 (JEWETT; BONAVIDA, 1994), apesar da expressão de IL-2 também ser reduzida em culturas de células tratadas com PTX (FUNK *et al.*, 1995). A produção de outras citocinas proinflamatórias também é inibida *in vitro* e *in vivo* com

o tratamento com PTX, tais como IL-1 $\beta$  (NEUNER *et al.*, 1994; VAN FURTH *et al.*, 1997; REIMUND *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000), IFN- $\gamma$  (FUNK *et al.*, 1995; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000; SAMARDZIC *et al.*, 2001), de IL-6 (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000), IL-8 (MARTICH *et al.*, 1991; NEUNER *et al.*, 1994; GUTIERREZ-REYES *et al.*, 2006) e IL-12 (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000; SAMARDZIC *et al.*, 2001) e IL-18 (SAMARDZIC *et al.*, 2001). A supressão de citocinas inflamatórias pode ser pelo efeito inibitório na ativação de NF- $\kappa$ B (JI *et al.*, 2004).

Em contraste com a bem documentada ação anti-TNF- $\alpha$ , o papel da inibição da produção de algumas citocinas é contraditório. A incubação de PTX em macrófagos peritoneais (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000) e em cultura de epitélio alveolar (HADDAD *et al.*, 2002) provocou supressão de IL-6. No entanto, outros trabalhos *in vitro* não mostraram alteração significativa nos níveis de IL-6 em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) tratadas com PTX (NEUNER *et al.*, 1994; FUNK *et al.*, 1995; REIMUND *et al.*, 1997). *In vivo*, o tratamento com PTX reduziu a ativação de IL-6 em PBMCs (NEUNER *et al.* 1994) e em intestino de ratos tratados com lipopolissacarídeo (LPS) (JI *et al.*, 2004), mas não teve efeito na expressão de IL-6 em suínos com pleuropneumonia (MYERS *et al.*, 2002). Em relação a IL-8, a PTX não modificou significativamente sua expressão em alguns estudos *in vitro* (REIMUND *et al.*, 1997; MYERS *et al.*, 2002) e *in vivo* (MYERS *et al.*, 2002), apesar de Neuner *et al.* (1994) e Gutierrez-Reyes *et al.* (2006) terem relatado *down regulation* desta citocina após tratamento com PTX.

O efeito regulador da PTX sobre IL-10, uma citocina antiinflamatória, parece ser dependente da concentração da droga. Assim, concentrações maiores ( $10^{-3}$  M) provocaram sua inibição, enquanto o uso em menor concentração ( $10^{-4}$  M), induziu produção aumentada (D'HELLEN COURT *et al.*, 1996). *In vitro*, alta concentração de PTX também inibiu a produção de IL-10 em macrófagos ativados com LPS. Esta inibição ocorreu juntamente com a redução da subunidade IL-12p35 e com o aumento da síntese de IL-12p40 (MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000). Ji *et al.* (2004), em modelo de sepse induzida por LPS, quando utilizaram a PTX (doses de 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/kg) observaram aumento na expressão de IL-10 mRNA, sendo que o efeito maior ocorreu na dose de 25 mg/kg.

#### 1.4.2 Talidomida (TLD)

A talidomida (TLD), uma  $\alpha$ -N-fitalimidoglutarimida, foi descoberta por Wilhelm Kunz, em 1954 (KUNZ *et al.*, 1956). Em 1957, foi comercializada como droga hipnótico-sedativa, amplamente vendida nos países europeus, asiáticos, no Canadá e América do Sul, tornando-se o medicamento mais vendido na Alemanha Ocidental (ERIKSSON *et al.*, 2001). No início da década de 1960, ela foi prescrita como sedativo e agente antinaúseas indicado para gestantes, sendo responsável pelo nascimento de milhares de crianças com deformações congênitas como focomelia (encurtamento de membros), amelia (ausência de membros) e alterações em orelhas, olhos, coração e sistema gastrintestinal (KLAUSNER *et al.*, 1996; CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; MATTHEWS; McCOY, 2003). Após a confirmação de seus graves efeitos teratogênicos, a TLD teve sua licença de comercialização cancelada (MATTHEWS; McCOY, 2003).

Outros efeitos colaterais têm sido descritos com uso da TLD, entre eles destacam-se: o aparecimento de neuropatia periférica, sonolência, astenia, parestesia (CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001), tontura, alterações do humor, constipação e leucopenia (CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000).

Apesar da sua proibição, em 1965, o médico israelita Jacob Sheskin prescreveu TLD como sedativo para pacientes com hanseníase, observando que estes apresentaram uma acentuada redução da dor e do processo inflamatório associado ao eritema nodoso da lepra (SHESKIN, 1965). Posteriormente, pesquisadores demonstraram que estes pacientes apresentaram níveis sanguíneos aumentados de TNF- $\alpha$  (SARNO *et al.*, 1991) e que a TLD possui a capacidade de inibição desta citocina, quando expressa em quantidade superior, denotando, pois, o seu potencial imunomodulador (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; TAVARES *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004). Em 1998, o seu uso para o tratamento da lepra foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), marcando definitivamente o seu renascimento, que é atualmente um dos principais agentes terapêuticos para o tratamento do leproma (JAKEMAN; SMITH, 1994).

A TLD ressurgiu como fármaco promissor para o tratamento de outras desordens sistêmicas, devido às suas propriedades antiinflamatórias, imunossupressoras, antiangiogênicas, antivirais (KLAUSNER *et al.*, 1996; MATTHEWS; McCOY, 2003) e anticaquexia (KLAUSNER *et al.*, 1996; MATTOX,

2005). Assim, seu uso tem sido pesquisado em patologias como artrite reumatóide (HUIZINGA *et al.*, 1996; CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000), doença de Crohn (ERIKSSON *et al.*, 2001; BAUDITZ *et al.*, 2002), câncer (CWILICH *et al.*, 2001; GOVINDARAJAN, 2000; TEO, 2005; DU *et al.*, 2005; VILLALONA-CALERO *et al.*, 2007), síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (KLAUSNER *et al.*, 1996; CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001), tuberculose (KLAUSNER *et al.*, 1996; TAVARES *et al.*, 1997), síndrome de Behçet (SHEK; LIM, 2002; CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001), lúpus eritematoso discóide (CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000, ERIKSSON *et al.*, 2001), mieloma múltiplo (RAJKUMAR *et al.*, 2000; CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001; MATTHEWS; McCOY, 2003). O uso da TLD como agente imunossupressor tem sido descrito na doença do enxerto-versus-hospedeiro, após o transplante de medula (VOGELSANG *et al.*, 1989).

No Brasil, existe uma legislação referente ao uso de TLD, que só pode ser utilizada nas seguintes doenças em programas oficiais: hanseníase (na reação hansênica tipo eritema nodoso), AIDS (nas úlceras aftóides idiopáticas), lúpus eritematoso e doença enxerto-versus-hospedeiro. No momento da prescrição, o paciente deverá receber um termo de esclarecimento e deverá preencher um termo de responsabilidade (BRASIL, 1998).

Nos últimos anos, há um interesse no desenvolvimento de análogos da TLD, visando à obtenção de suas características farmacológicas sem o seu efeito teratogênico. Vários análogos da TLD foram sintetizados como lenalidomide, revlimid, CC-5013, CC-4047 e ACTIMID, que possuem potente atividade antiinflamatória e anticâncer (TEO, 2005).

Os mecanismos moleculares do efeito da TLD não são totalmente esclarecidos, apesar de seus efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores serem bem demonstrados *in vitro* e *in vivo* (CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001). É bem documentado pela literatura que a TLD reduz o TNF- $\alpha$  (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; MOREIRA *et al.*, 1997; TAVARES *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004). *In vitro*, a TLD inibiu a síntese de TNF- $\alpha$  em cultura de monócitos humanos estimulados com LPS e produtos de *M. leprae* (SAMPAIO *et al.*, 1991, MOREIRA *et al.*, 1993) e em cultura de macrófagos obtida do lavado broncoalveolar de pacientes com tuberculose (TAVARES *et al.*, 1997). *In vivo*, após

administração de TLD observou-se menor síntese de TNF- $\alpha$  após o desafio com LPS para induzir choque séptico (MOREIRA *et al.*, 1997).

O bloqueio na produção de TNF- $\alpha$  parece não ser completo (MOREIRA *et al.*, 1993). *In vitro*, a TLD reduz a síntese de TNF- $\alpha$  através do aumento da degradação do mRNA (MOREIRA *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 2004), reduzindo a meia-vida da molécula de 30 para 17 minutos (MOREIRA *et al.*, 1993).

Em vários estudos, a inibição induzida por TLD mostrou ser específica para TNF- $\alpha$  (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; TAVARES *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004). A literatura relata que a TLD não afetou os níveis de IL-1 $\beta$  (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; MOREIRA *et al.*, 1997; BAUDITZ *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004), IL-6 (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; BAUDITZ *et al.*, 2002), IL-8 (KIM *et al.*, 2004), fator estimulante das colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (SAMPAIO *et al.*, 1991), IFN- $\gamma$  (MOREIRA *et al.*, 1997). Entretanto, outros autores demonstraram que a TLD também suprime a produção de IL-12 em PBMCs (MOLLER *et al.*, 1997) e em indivíduos com doença de Crohn (BAUDITZ *et al.*, 2002). Corral e Kaplan (1999) descrevem que a droga tem um duplo efeito nos níveis de IL-12, reduzindo esta citocina quando PBMC são estimulados por LPS, embora aumente quando estas células são ativadas via receptor de células T (*upregulation* na expressão de células T tipo CD40). *In vivo*, a TLD inibiu os níveis séricos TNF- $\alpha$  em 93% e IL-6 em 50%, bem como estimulou a produção de IL-10 (MOREIRA *et al.*, 1997).

A TLD também tem efeito em outros componentes da função celular (MATTHEWS; McCOY, 2003). A pré-incubação de PMN com TLD inibiu a quimiotaxia (FAURE *et al.*, 1980; DUNZENDORFER *et al.*, 1997). Outro mecanismo antiinflamatório apontado por Fujita *et al.* (2001), é que a TLD e seus análogos inibem a indução de COX-2 mediada por LPS, reduzindo a produção de PGE<sub>2</sub>. Parece também que ela tem um papel na regulação dos linfócitos auxiliares, conhecidos como T-*helper* (Th). *In vitro*, em cultura de PBMCs, a TLD induziu aumento na produção de linfócitos Th2 e de IL-4 e IL-5; e inibiu a produção de linfócitos Th1 e IFN- $\gamma$  (McHUGH *et al.*, 1995). Entretanto, Verbon *et al.* (2000) demonstraram que em indivíduos saudáveis, a administração de uma dose (v.o.) de TLD aumentou IFN- $\gamma$  e reduziu IL-5, sem afetar os níveis de IL-2 e IL-4 em PBMCs. *In vitro* e *in vivo*, dados sugerem que a TLD pode aumentar o número e a função de células natural *Killer* (NK), melhorando a imunidade celular (DAVIES *et al.*, 2001).

O potencial antineoplásico da TLD provavelmente se deve ao seu efeito antiangiogênico e imunomodulador, bem como a sua ação indutora de apoptose (CWILICH *et al.*, 2001; TEO, 2005). A atividade antiangiogênica ocorre por bloqueio do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEFG) (TEO, 2005; MATTHEWS; McCOY, 2003). A TLD ainda inibe o crescimento tumoral por degradação da COX-2 (DU *et al.*, 2005) e por estimular a proliferação de linfócitos T, aumentando a atividade citotóxica anticâncer (TEO, 2005).

Alguns estudos têm sugerido que o efeito antiinflamatório e antiangiogênico da TLD pode ser mediado pelo bloqueio na ativação de NF- $\kappa$ B, através da inativação do inibidor kappa B (I $\kappa$ B) kinase (KEIFER *et al.*, 2001; MAJUMDAR *et al.*, 2002). Recentemente, mostrou-se que a administração de TLD pode melhorar potencial terapêutico do CPT-11, pela sua capacidade de inibir o NF- $\kappa$ B, responsável em induzir mecanismos de resistência a este agente antitumoral (VILLALONA-CALERO *et al.*, 2007).

#### 1.4.3 Celecoxibe (CLX)

Desde 1899, quando o químico alemão Felix Hoffman motivou a Bayer a produzir o ácido acetilsalicílico, patentado como aspirina, as drogas antiinflamatórias não-esteróides (DAINEs) passaram a ser os agentes mais largamente utilizados em todo mundo, apesar do seu mecanismo de ação somente ter sido esclarecido em 1971, por John Vane (VANE *et al.*, 1990). Vane propôs que estes agentes suprimem o processo inflamatório pela inibição da COX, impedindo assim a síntese das PGs (VANE, 1971).

Com a descoberta da COX-2, uma nova perspectiva terapêutica apareceu com o desenvolvimento de drogas mais seletivas e com menores efeitos adversos, os inibidores seletivos da COX-2 (VANE; BOTTING, 2003). Os inibidores não seletivos de COX-2 inibem não somente a resposta inflamatória, mas também a produção fisiológica de PGs que protege a mucosa do trato gastrointestinal da destruição do ácido clorídrico e mantém o funcionamento normal dos rins e o processo de agregação plaquetária quando requerido (VANE *et al.*, 1998; VANE; BOTTING, 2003). Mais recentemente, novas motivações para o uso clínico foram

encontradas com a descrição de uma terceira variante da ciclooxigenase, a COX-3 (WILLOUGHBY *et al.*, 2000; CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

A primeira geração dos inibidores específicos da COX-2 é representada pelo nimesulide, etodalaco e meloxicam. A descoberta da especificidade destes compostos foi constatada após a comercialização, pela observação clínica e experimental da reduzida incidência dos efeitos colaterais gastrintestinais. Posteriormente, a utilização das técnicas de cristalografia de raios X permitiu a elucidação gradativa da estrutura das COXs. Então, a partir da modificação molecular dos primeiros inibidores de COX-2, visando o aumento da seletividade sobre COX-2, foram sintetizadas estruturas com grupamento carboxílico e com presença de grupos sulfonamida ou sulfona, originando os inibidores seletivos de segunda geração, como o celecoxibe (CLX) (HINZ; BRUNE, 2002).

Em modelos animais e em seres humanos, o CLX é absorvido rapidamente e metabolizado através de uma via oxidativa (PAULSON *et al.*, 2001). A inibição da COX-2 ocorre através da formação de um complexo enzima-inibidor fortemente ligado, que se dissocia lentamente. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que o CLX possui baixa afinidade para COX-1, portanto, ele não interfere nos processos fisiológicos normais da enzima no estômago, intestinos, plaquetas e rins, reduzindo os efeitos colaterais (VANE *et al.*, 1998; VANE; BOTTING, 2003).

O CLX foi aprovado em 1998 pela FDA como agente antiinflamatório e analgésico (HINZ; BRUNE, 2002). Os inibidores seletivos de COX-2 também têm sido testados no tratamento e prevenção de alguns tipos de câncer (VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002; GROSCHE *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos e *in vitro* em modelos animais evidenciaram que COX-2 tem participação em alguns processos neoplásicos, notadamente câncer de cólon (VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002; GROSCHE *et al.*, 2006). A superexpressão de COX-2 aumenta a proliferação celular e inibe a apoptose (GROSCHE *et al.*, 2006). Assim, os inibidores específicos da COX-2 podem oferecer uma alternativa terapêutica profilática na redução de PGs nestes indivíduos (HINZ; BRUNE, 2002; GROSCHE *et al.*, 2006).

Alguns achados sugerem que as PGs derivadas de COX-2 contribuem no processo patológico da doença de Alzheimer. A proteína amiloide é capaz de ativar a microglia, induzindo a elevação da expressão neuronal de COX-2, que potencializa o

processo oxidativo, induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias, acelerando o processo de neurodegeneração (VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002).

Por outro lado, atualmente a literatura tem relatado o aumento de eventos tromboembólicos com o uso prolongado dos inibidores de COX-2. O CLASS (*Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*), um estudo retrospectivo, verificou que o CLX apresenta potencial de aumentar o risco dos eventos cardiovasculares, pelo fato de os inibidores de COX-2 permitirem o aumento de COX-1 (MUKHERJEE *et al.*, 2001).

### 1.5 Justificativa e objetivos

A literatura mostra que a mucosite intestinal associada à diarreia é um grave efeito tóxico do CPT-11 (IKUNO *et al.*, 1995; SALIBA *et al.*, 1998; ZIDAN *et al.*, 2003; GIBSON *et al.*, 2003; SALTZ *et al.*, 2003; ALIMONTI *et al.*, 2004; BOWEN *et al.*, 2006), que pode levar à desidratação, à má-absorção dos nutrientes e conseqüentemente à deterioração do estado geral do paciente (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS, 2004; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006). Além disso, a mucosite juntamente com a neutropenia, outro efeito colateral do CPT-11, é um fator de risco para septicemia e translocação bacteriana, podendo este quadro provocar complicações como obstrução intestinal, perfuração e formação de fístulas (SONIS, 2004; AVRITSCHER *et al.*, 2004). Na presença de diarreia grave pode-se necessitar reduzir a dose do fármaco ou até mesmo suspender a sua administração, interferindo na eficácia do tratamento do câncer (ABIGERGES *et al.*, 1994; IKEGAMI *et al.*, 2002; DUNCAN; GRANT, 2003; ALIMONTI *et al.*, 2004).

Apesar do impacto das manifestações clínicas, os mecanismos fisiopatológicos e moleculares responsáveis pelo curso da mucosite intestinal ainda não são bem estabelecidos (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006). Do mesmo modo, ainda não se tem um protocolo padrão para a prevenção e controle da diarreia (GIBSON *et al.*, 2002a e 2002b; ALIMONTI *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006).

Sabe-se que a mucosite intestinal induzida por agentes quimioterápicos provoca danos nas células epiteliais e conseqüente resposta inflamatória local

(DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004a, SONIS, 2004). No entanto, são escassos os dados sobre a participação de mediadores inflamatórios nesta condição. Desta forma, o estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 torna-se relevante. Além disso, o esclarecimento destes mecanismos aponta para a possibilidade de uso de moduladores específicos da resposta imunológica e da inflamação para o tratamento e controle da mucosite intestinal induzida por esta droga, melhorando a qualidade de vida e reduzindo a incidência de co-morbidades. Isto permitirá maior liberdade de tratamento, propiciando maior efetividade no uso deste agente farmacológico.

Assim, o objetivo geral do presente estudo foi estudar os mediadores inflamatórios responsáveis pelos eventos que acompanham a mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 em camundongos *Swiss*. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver o modelo de mucosite intestinal induzido por CPT-11 em camundongos, reproduzindo as alterações morfo-funcionais e histológicas clássicas.
- Avaliar o papel de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC) na fisiopatologia dos eventos inflamatórios da mucosite intestinal induzida por CPT-11.
- Avaliar a possível participação do óxido nítrico (NO) e das prostaglandinas (PGs) na lesão intestinal provocada pelo CPT-11, através do estudo imunohistoquímico para detecção da expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2).
- Estudar o efeito de inibidores farmacológicos da síntese e liberação de citocinas como pentoxifilina (PTX) e talidomida (TLD) na lesão intestinal induzida pelo CPT-11.
- Verificar o efeito de um inibidor seletivo da COX-2, celecoxibe (CLX), na lesão intestinal provocada pelo CPT-11.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos *Swiss*, do sexo masculino, com massa corpórea variando entre 25 a 30 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Estes animais acomodaram-se dois dias antes do experimento em gaiolas e permaneceram nas mesmas condições nos dias da pesquisa.

Todos foram mantidos em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas em estante ventilada. A dieta oferecida foi ração balanceada utilizada rotineiramente no biotério, e água à vontade. Os experimentos realizados seguiram o Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório, estipulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que segue as normas da *National Research Council* (U.S.A., 1996). O projeto foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC (protocolo 02/04 – ANEXO 1).

### 2.2 Drogas, soluções, corantes e anticorpos

- Cloridrato de irinotecano – CPT-11 (Camptosar ®: ampolas 5 mL – 100 mg/mL, Pharmacia & Upjohn Co, Kalamazoo, EUA)
- Pentoxifilina (Trental ®: ampolas de 5 mL – 20 mg/mL, Hoechst, São Paulo, Brasil)
- Talidomida (comprimidos de 100 mg, CEME, Brasil)
- Celecoxibe (Celebra ®: cápsulas de 100 mg, Searle, São Paulo, Brasil)
- Solução salina: cloreto de NaCl a 0,9% (15M): frasco de 500 mL (Tayuyna)
- Dimetil sulfóxido (DMSO ®: Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)

- Álcool etílico 70% (Reagen)
- Cloral hidratado 10%: (Reagen)
- Formaldeído 40% (Reagen)
- Tampão fosfato de potássio: solução A – 988mL + solução B – 12mL

## Solução A:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Synth).....	6,8 g
Água destilada	1 L

## Solução B:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Synth).....	8,7 g
Água destilada .....	1 L

- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)

HTAB (Sigma).....	5 g
Tampão fosfato de potássio .....	1 L

- Peróxido de hidrogênio (0,1%)

Peróxido de hidrogênio 30% (Vetec) .....	1 mL
Água destilada .....	29 mL

- Solução de o-dianisidina

O-dianisidina (Sigma) .....	16,7 mL
Tampão fosfato de potássio .....	10 mL
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50 µL
Água destilada .....	90 mL

- Líquido de Turk

Ácido acético glacial P. A. (Merck) .....	20 mL
Violeta de genciana .....	2 mL
Água destilada .....	1 L

- Hematoxilina (Reagen)

- Eosina (Merck)

- Hematoxilina de Mayer (Reagen)

- Vectastatin - kit ABC (Vector)

- Anticorpo primário policlonal de carneiro anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  e anti-KC

(National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC, UK)

- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de carneiro (National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC, UK)

- Anticorpo primário policlonal de carneiro anti-TNF- $\alpha$  e anti-COX-2 (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo primário policlonal de coelho anti-1 $\beta$  e anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de carneiro (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)
- Anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho (Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)

### **2.3 Modelo de indução da mucosite intestinal**

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

Inicialmente, realizou-se um estudo piloto com o objetivo de se escolher a dose que induz injúrias consistentes nas mucosas intestinais com o mínimo de letalidade. Os animais foram tratados com CPT-11 nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg ou solução salina 0,9% (0,5 mL), administrados por via intraperitoneal (i.p) durante quatro dias consecutivos.

Verificou-se que a administração do CPT-11 (75 mg/kg) durante quatro dias consecutivos induziu a mucosite e diarreia com menor índice de mortalidade, comparado com a dose de 100 mg/kg. Diante destes achados, resolveu-se seguir este protocolo experimental, utilizando-se, entretanto, CPT-11 em menor dose (75 mg/kg). Os animais foram sacrificados no quinto ou sétimo dias experimentais para o estudo dos aspectos relacionados à mucosite intestinal e para se testar o efeito de diferentes classes de drogas no desenvolvimento e nos eventos que acompanham a mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 em camundongos *Swiss*. A escolha destes dias baseou-se no fato do aparecimento da diarreia ter início no sexto dia, sendo que no sétimo dia observou-se maior pico da diarreia, maior perda de peso e maior mortalidade, demonstrando a presença de um processo patológico severo. O protocolo do modelo experimental utilizado pode se visto na Figura 2.

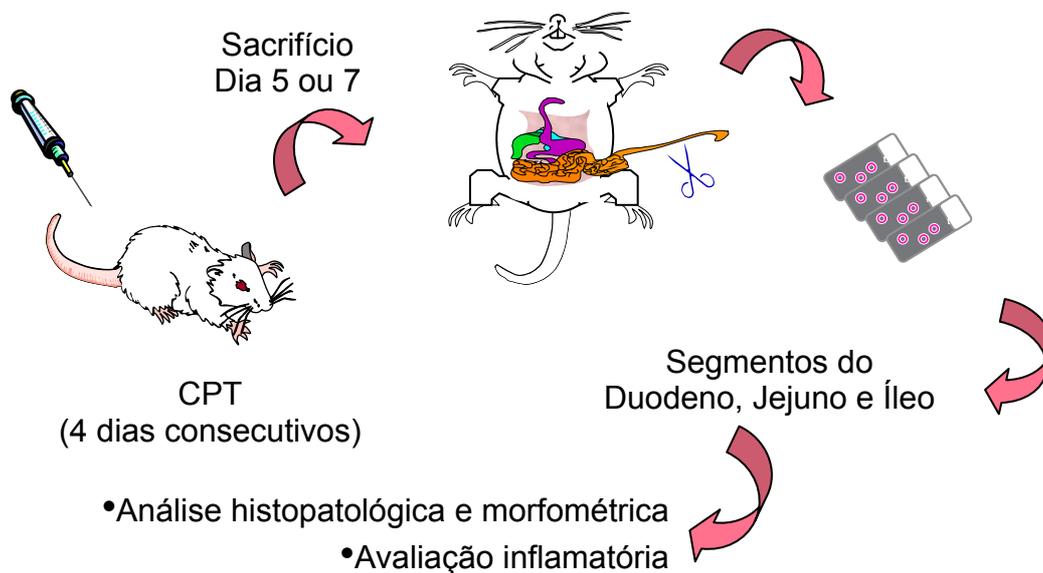


FIGURA 2 – Desenho esquemático do protocolo da mucosite intestinal experimental.

A mucosite intestinal foi induzida através da administração de CPT-11 (75 mg/kg) por quatro dias consecutivos. Os animais foram sacrificados no quinto ou sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para análise histopatológica, morfométrica e avaliação inflamatória (atividade de mieloperoxidase, dosagem de citocinas, avaliação da expressão de citocinas e das enzimas óxido nítrico sintase induzida – iNOS e ciclooxigenase-2 - COX-2).

## 2.4 Grupos experimentais

Os animais foram submetidos aos protocolos de acordo com os grupos experimentais discriminados a seguir, com o objetivo de avaliar o efeito de agentes farmacológicos na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11, a fim de determinar os componentes inflamatórios responsáveis pela mesma.

Todos os tratamentos seguiram o esquema proposto por Trifan *et al.* (2002). Os animais foram tratados durante sete dias consecutivos, com início um dia antes da indução da mucosite intestinal pelo CPT-11. Considerou-se como primeiro dia experimental o início da administração do CPT-11. O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo 8 (oito)

### 2.4.1 Grupo normal

Este grupo foi constituído por animais não submetidos à mucosite intestinal e que receberam o veículo utilizado na diluição da droga em estudo, administrada pela mesma via utilizada pelo grupo experimental.

### 2.4.2 Grupo controle

Este grupo foi constituído por animais submetidos à mucosite intestinal e que receberam o veículo utilizado na diluição da droga em estudo, administrada pela mesma via utilizada pelo grupo experimental.

### 2.4.3 Grupo tratado com PTX

Os animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11 foram divididos em 3 (três) grupos, os quais receberam PTX nas doses de 1,7, 5 e 15 mg/kg, administrada por via subcutânea (s.c). A PTX foi diluída em solução salina 0,9%.

#### 2.4.4 Grupo tratado com TLD

Os animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11 foram divididos em 3 (três) grupos, os quais receberam TLD nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg, administrada por via subcutânea (s.c). A TLD foi diluída em solução a 2% de dimetil sulfóxido (DMSO) em salina 0,9%.

#### 2.4.5 Grupo tratado com CLX

Os animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11 foram divididos em 3 (três) grupos, os quais receberam celecoxibe nas doses 3, 10 e 30 mg/kg, administrado por gavagem (v.o.). O CLX foi diluído em água destilada.

### 2.5 Parâmetros avaliados

#### 2.5.1 Avaliação da diarreia

A severidade da diarreia foi monitorada duas vezes ao dia, durante todo o período experimental (sete dias), utilizando-se os escores descritos por Kurita *et al.* (2000), onde se tem: 0 – normal, ausência de diarreia; 1 – diarreia leve, fezes levemente umedecidas; 2 – diarreia moderada, fezes sem formas com presença de quantidade moderada de sujidades na região perianal; e 3 – diarreia grave, fezes aquosas com grande quantidade de sujidades na região perianal.

A diarreia que apareceu até uma hora após a administração do CPT-11 foi considerada diarreia precoce; e a que foi observada depois de 6-24 horas após a administração foi considerada tardia (KASE *et al.*, 1997; ARIMORI *et al.*, 2001).

#### 2.5.2 Análise ponderal

Os animais tiveram a massa corporal avaliada diariamente durante todo o período experimental, em balança tipo Filizola, com capacidade de 6000g e sensibilidade de 1g. Este parâmetro era avaliado imediatamente antes da

administração do agente quimioterápico, e, após o término da administração do CPT-11, diariamente, sempre pela manhã até o sétimo dia. Os valores encontrados foram expressos como variação de massa corpórea (g), obtida através das diferenças das massas corpóreas determinadas diariamente e a inicial.

### 2.5.3 Leucograma

Os animais foram anestesiados com éter e, em seguida, colhidas amostras de sangue periférico por punção na artéria ocular, imediatamente antes do sacrifício. Utilizou-se 20  $\mu\text{L}$  de sangue diluído em 380  $\mu\text{L}$  do líquido de Turk para contagem do número total de leucócitos em câmara de Neubauer, conforme metodologia descrita por Moura *et al.* (1998). Os valores foram expressos em número total de leucócitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$ .

### 2.5.4 Avaliação da sobrevida

Diariamente registrou-se a mortalidade dos animais em cada grupo experimental para se avaliar a taxa de sobrevida em cada tratamento.

### 2.5.5 Análise histopatológica e morfométrica

Após o sacrifício dos animais, foram removidos segmentos do duodeno, jejuno e íleo. A seguir, tais espécimes foram fixados em formalina tamponada 10% e processados para coloração pelo método hematoxilina-eosina (H&E).

A caracterização histopatológica foi realizada através de um microscópio Nikon com um aumento de 100 e 400x. Neste estudo foram analisados os aspectos dos vilos e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório. O grau de severidade da mucosite foi graduado de acordo com os seguintes escores descritos por Woo *et al.* (2000): 0 – ausência de lesão; 1 – menos de 10% das criptas contêm células necróticas; 2 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta; 3 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (< 20%), os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes;

4 – semelhante à 3, entretanto, é mais extensa a perda da arquitetura das criptas e o encurtamento dos vilos.

Na análise morfométrica, utilizou-se microscópio Nikon com objetivas 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x. As variáveis morfométricas avaliadas incluíram altura dos vilos, considerada desde o topo até a base, correspondente à junção cripta/vilo; e profundidade das criptas, definida como a invaginação entre os vilos adjacentes (CARNEIRO FILHO *et al.*, 2004). Estas medidas realizaram-se com auxílio do programa de computador *NIH image* (U.S.A, 2005), considerando-se a média aritmética destas medidas obtidas entre cinco a dez locais diferentes. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).

#### 2.5.6 Atividade de mieloperoxidase (MPO)

No momento do sacrifício, uma porção do intestino foi processada para mensuração da atividade de MPO, segundo método adaptado pelo descrito por Bradley *et al.* (1982). Esta análise teve a finalidade de avaliar a reação inflamatória da mucosite intestinal induzida por CPT-11, pois esta enzima é um marcador do conteúdo de neutrófilos nos tecidos.

As amostras obtidas foram pesadas e mantidas à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio. Durante a determinação, as amostras foram trituradas por duas vezes em homogeneizador *Politron Ultra-Turrax* em solução tampão, sob condições adequadas de refrigeração. A seguir, estas foram centrifugadas (centrífuga 5804R) a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , durante dez minutos, com frequência de 4.200 rpm. O sobrenadante, então, foi colhido para determinação da atividade de MPO por ensaio colorimétrico, com uso de um leitor de ELISA, utilizando-se uma placa com 96 poços e realizando-se duas leituras. Os valores encontrados foram expressos em unidade de MPO/mg de tecido.

#### 2.5.7 Dosagem de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno

A produção de citocinas foi determinada através do conteúdo dessas citocinas no tecido da mucosa intestinal. Após o sacrifício dos animais (5 $^{\circ}$  e 7 $^{\circ}$  dia experimental), foram removidos segmentos do duodeno e estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para

posterior homogeneização e coleta do sobrenadante para dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC, segundo descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção das concentrações destas citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme protocolo de Cunha *et al.* (1993), o qual seguiu as etapas: (1) incubação com 2  $\mu$ g/mL de anticorpo anti-TNF, anti-IL-1 $\beta$  e anti-KC diluídos em tampão de bicarbonato (pH 8.2) – 100  $\mu$ L/poço (placa de 96 poços) por 16-24h a 4°C; (2) lavagem da placa (3x) com PBS-tween 20, 0,1% v/v; (3) bloqueio com albumina bovina 1% diluída em tampão de lavagem, 100  $\mu$ L/poço por duas horas à temperatura ambiente; (4) lavagem da placa (3x); (5) incubação com a curva padrão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC diluída em tampão de lavagem e das amostras a serem dosadas (100  $\mu$ L/poço por 16-24h a 4°C); (6) lavagem da placa (3x); (7) incubação com anticorpo biotilado diluído 1:1.000 em tampão de lavagem contendo 1% de soro normal de carneiro por uma hora à temperatura ambiente; (8) lavagem da placa (3x); (9) incubação com avidina-peroxidase (DAKO) diluída 1:5.000 em tampão de lavagem, 100  $\mu$ L/poço por 15 minutos à temperatura ambiente; (10) lavagem da placa (3x); (11) incubação com o-fenilenediamina diidrocloreto (OPD) em tampão substrato, 100  $\mu$ L/poço, cobriu-se a placa e deixou-se no escuro por 5-20 minutos à temperatura ambiente; (12) a reação foi paralisada com 150  $\mu$ L/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M; (13) leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL como a curva padrão.

#### 2.5.8 Avaliação da expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS, COX-2) por imunohistoquímica

Imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2 foi realizada utilizando-se o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU *et al.*, 1981). No sétimo dia, os animais foram sacrificados e tiveram o duodeno removido e fixado em formol 10% por 24 horas para confecção de lâminas apropriadas para imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena

com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (15 minutos). Os cortes foram então incubados *overnight* (4°C) com os anticorpos primários anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-iNOS e anti-COX-2, diluídos em PBS com albumina sérica bovina 5% (PBS-BSA) na concentração 1:200, 1:400, 1:200 e 1:200, respectivamente. Após a lavagem no dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG, diluídos 1:200 ou 1:400 em PBS-BSA, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto-avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain ®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguida por contracoloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

O grau de expressão foi avaliado por escores descritos por Yeoh *et al.* (2005), onde se tem: 0 – sem marcação; 1 – leve marcação; 2 – moderada marcação; 3 – moderada a intensa marcação e 4 – intensa marcação.

## 2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad Prisma, version 4.01 (2004). Nos escores de avaliação da diarreia e análise do grau de mucosite, os dados obtidos foram expressos como mediana (md) acompanhada pelos respectivos valores extremos do rol de dados e comparados através do teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. As taxas de sobrevivência foram calculadas pelo teste de Kaplan-Meier e os dados analisados pelo teste de Logrank. Nos demais parâmetros, os resultados foram expressos como média acompanhada pelo erro padrão da média (média  $\pm$  EPM) e para comparação utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Em todos os parâmetros, considerou-se estatisticamente significativa  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Modelo da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Para se estabelecer o modelo de mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*, inicialmente se testou as doses de 50, 75 e 100 mg/kg de peso, administradas pela via intraperitoneal (i.p.) durante quatro dias consecutivos. A escolha de tais doses baseiou-se no modelo descrito por Ikuno *et al.* (1995), que administraram 100 mg/kg (i.p.) durante quatro dias consecutivos.

##### 3.1.1 Avaliação da diarreia induzida pelo CPT-11

A Tabela 1 mostra que o CPT-11 administrado por quatro dias consecutivos, nas doses de 75 e 100 mg/kg, induziu diarreia tardia quando comparado aos animais que receberam solução salina.

A diarreia precoce referida pela literatura (Jansman *et al.*, 2001; Rubenstein *et al.*, 2004) foi observada nos grupos administrados com CPT-11 nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, porém a sua incidência na maioria dos animais foi de grau leve (escore 1) e não apresentou significado estatístico ( $p > 0,05$ ). No primeiro dia, após uma hora da administração da droga, as doses de 75 e 100 mg/kg induziram diarreia leve em 25% e 37,5% dos animais. No segundo e terceiro dias, a dose de 75 mg/kg provocou diarreia leve em 35,5% e a de 100 mg/kg em 43,75%, sendo que no terceiro dia no grupo em que se administrou a maior dose, um animal (6,25%) apresentou diarreia de grau moderado (escore 2). No quarto dia, a incidência da diarreia precoce foi maior, 50% para o grupo que recebeu 75 mg/kg e 56,25% para os animais administrados com CPT-11 em 100 mg/kg, destes apenas um animal (6,25%) dos que receberam maior dose apresentou diarreia grave (escore 3). O grupo administrado com CPT-11 (50 mg/kg) apresentou menor incidência de diarreia precoce, diarreia leve foi observada no segundo e quarto dias em 12,5% e em 25% dos animais, respectivamente.

Entretanto, a diarreia tardia (escore 3; 0-3) teve ocorrência significativa ( $p < 0,05$ ) nas doses de 75 e 100 mg/kg, com início no sexto e quinto dias experimentais, respectivamente. No sétimo dia experimental, diarreia grave (escore 3) encontrava-se presente em 83,33% dos animais que receberam a dose de 75 mg/kg, e em 87,35% nos que foram administrados 100 mg/kg.

### 3.1.2 Efeito do CPT-11 na variação da massa corpórea

A Figura 3 demonstra que o tratamento durante quatro dias com CPT-11, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg, provocou perda de peso significativa ( $p < 0,05$ ) em camundongos *Swiss*. A redução de peso teve início no quarto dia após o início da administração da droga e foi dose-dependente, sendo maior no grupo tratado com maior dose.

### 3.1.3 Efeito do CPT-11 no leucograma

Observa-se na Figura 4 que os animais tratados com CPT-11, nas doses de 50, 75 e 100 mg/kg por quatro dias consecutivos, apresentaram leucopenia ( $p < 0,05$ ). Redução maior no número total de leucócitos foi observada nos grupos que receberam maiores doses (75 e 100 mg/kg).

### 3.1.4 Efeito do CPT-11 na sobrevivência dos animais

Analisando-se a Figura 5, verifica-se que o CPT-11 provocou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de mortalidade de forma dose-dependente. No sétimo dia experimental, a dose de 100 mg/kg induziu morte em 50% dos animais, enquanto os grupos que receberam a quantidade de 75 e 50 mg/kg a mortalidade foi de 25% (sobrevivência de 75%) e 12,5% (sobrevivência de 87,5%), respectivamente.

TABELA 1 – Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na indução de diarreia em camundongos Swiss.

Dia	CPT-11			
	Salina	50 mg/kg	75 mg/kg	100 mg/kg
1º	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)
2º	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
3º	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-2)
4º	0 (0-0)	0 (0-1)	0,5 (0-1)	1 (0-3)
5º	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-3)	3 (0-3)*
6º	0 (0-0)	0 (0-2)	3 (0-3)*	3 (0-3)*
7º	0 (0-0)	0 (0-3)	3 (0-3)*	3 (0-3)*

Os animais receberam CPT-11 (50, 75 e 100 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). A diarreia foi avaliada por escores propostos por Kurita *et al.* (2000), onde se tem: 0 – normal, ausência de diarreia; 1 – diarreia leve, fezes levemente umedecidas; 2 – diarreia moderada, fezes sem formas com presença de quantidade moderada de sujidades na região perianal; e 3 – diarreia grave, fezes aquosas com grande quantidade de sujidades na região perianal. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

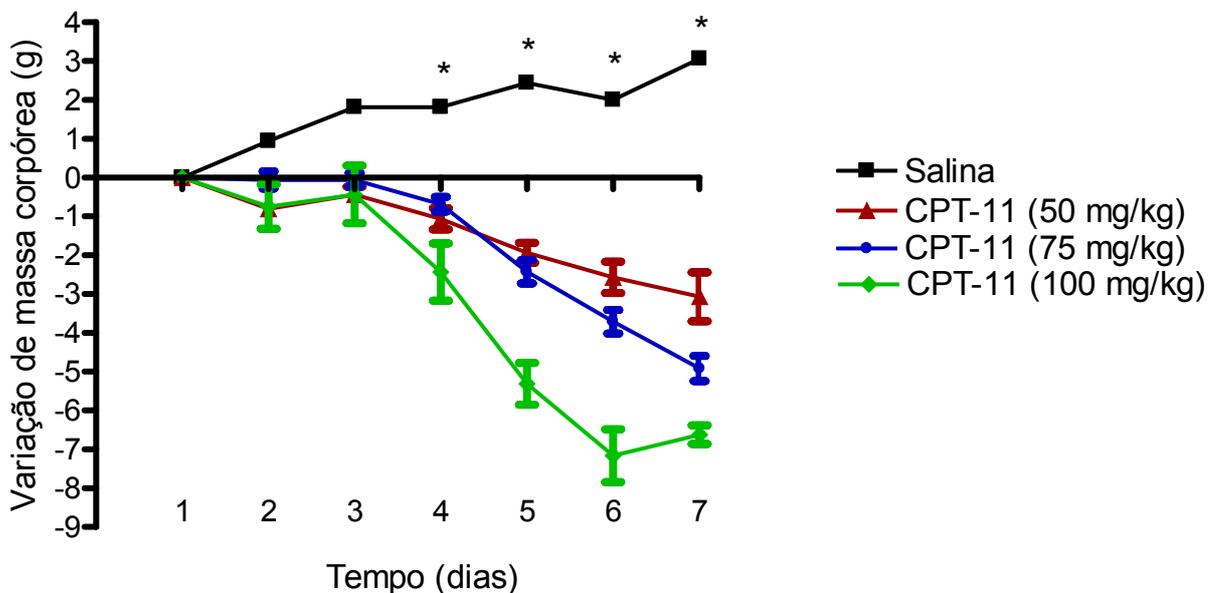


FIGURA 3 – Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na variação da massa corpórea de camundongos *Swiss*.

Os animais receberam CPT-11 (50, 75, 100 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). As massas corpóreas foram avaliadas diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam média  $\pm$  EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas corpóreas obtidas diariamente e a inicial. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com CPT-11 ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

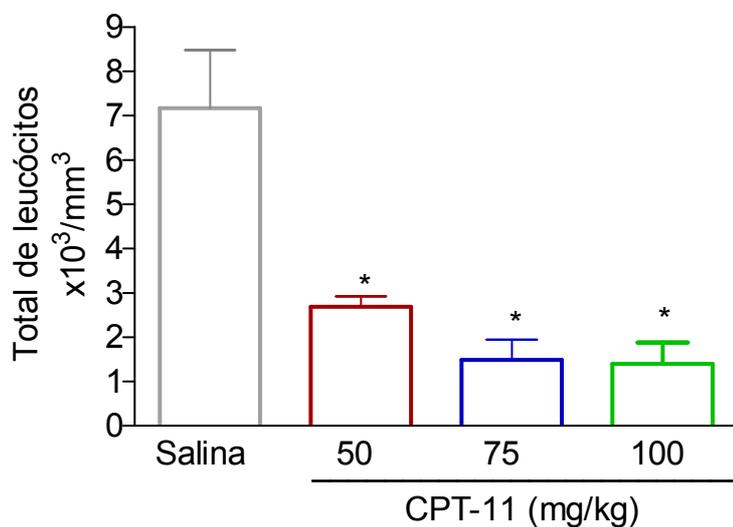


FIGURA 4 – Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) no leucograma de camundongos *Swiss*.

Os animais receberam CPT-11 (50, 75 e 100 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). O sangue foi colhido por punção na artéria ocular imediatamente antes do sacrifício e a contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, conforme descrito por Moura *et al.* (1998). Os valores representam média  $\pm$  EPM do número total de leucócitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$  e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

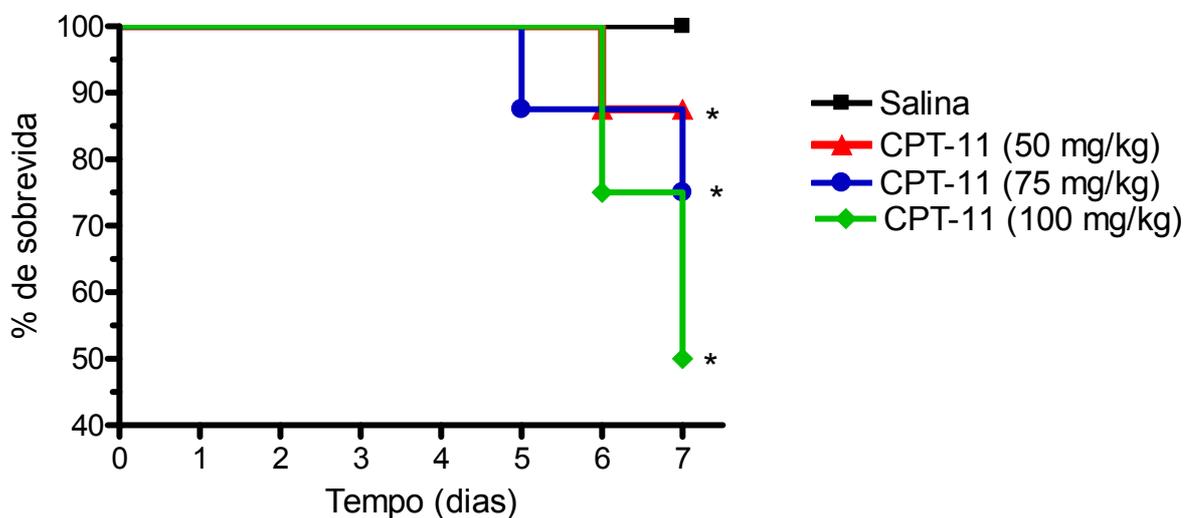


FIGURA 5 – Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na curva de sobrevivência de camundongos Swiss.

Os animais receberam CPT-11 (50, 75, 100 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). As taxas de sobrevivência foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de logrank. \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo dez.

### 3.1.5 Efeito do CPT-11 nas estruturas histológicas do intestino

A Figura 6 mostram as alterações histológicas observadas com o tratamento com CPT-11 na dose de 75 mg/kg por quatro dias consecutivos. Os animais que não receberam tratamento com CPT-11 apresentaram as estruturas intestinais (duodeno, jejuno e íleo) com vilosidades e criptas íntegras, com epitélio cilíndrico recobrimdo os vilos intestinais e a estrutura intacta das criptas com células de Paneth. Entretanto, nos animais submetidos ao tratamento durante quatro dias com CPT-11 nas doses de 75 e 100 mg/kg, observou-se encurtamento acentuado das vilosidades intestinais, necrose parcial de criptas, achatamento e vacuolização de enterócitos, presença de infiltrado celular inflamatório na mucosa com predomínio de células mononucleares e redução de células caliciformes. No íleo dos animais que foram injetados com CPT-11 (75 e 100 mg/kg) verificou-se infiltração muito acentuada de leucócitos mononucleares. Por outro lado, nos animais que receberam 50mg de CPT-11/kg também no período de quatro dias, as alterações estruturais do intestino não foram significativas. Verificou-se vacuolização de enterócitos, sendo as criptas preservadas no duodeno e jejuno. No íleo observou-se achatamento das vilosidades e uma destruição parcial das criptas.

Quando se analisou as lesões intestinais de acordo com a classificação do grau de mucosite intestinal pelos parâmetros descritos por Woo *et al.* (2000) observou-se que os animais tratados durante quatro dias consecutivos com CPT-11, nas doses de 75 e 100 mg/kg, apresentaram incidência significativa ( $p < 0,05$ ) de mucosite intestinal classificada como escore 4 nos três segmentos intestinais. Portanto, o CPT-11 nestas doses induziu lesões extensas nos vilos e criptas no duodeno, jejuno e íleo. Já o grupo que recebeu 50 mg/kg apresentou lesões significativas apenas no íleo, escore 4 (2-4). Neste grupo, no duodeno e jejuno observaram-se criptas com pequena redução de profundidade, mas com arquitetura intacta classificados com escores 2 (1-3) e 1 (1-3), respectivamente (Tabela 2).

A Figura 7 mostra os dados morfométricos dos vilos e criptas do duodeno, jejuno e íleo. Os resultados mostram que o CPT-11 nas doses administradas provocou encurtamento significativo nos vilos nas três porções intestinais de forma dose-dependente ( $p < 0,05$ ). No duodeno, verificou-se redução no tamanho dos vilos em torno de 33,10% no grupo que recebeu a dose de 50 mg/kg, 69,16% para o grupo de 75 mg/kg e 76,43% para o que recebeu 100 mg/kg. No jejuno, a redução do

tamanho dos vilos foi de 40,71%, 57,62% e 65% para as doses de 50, 75 e 100 mg/kg. No íleo, a medida dos vilos reduziu em 30,27%, 51,22% e 49,26% para as dose de 50, 75 e 100 mg/kg, respectivamente.

No duodeno e jejuno, a profundidade das criptas apresentou-se reduzida ( $p < 0,05$ ) nos grupos que receberam doses maiores em 22,08% e 24,60% no duodeno e 31,70% e 30,78% para o jejuno, nas doses de 75 e 100 mg/kg, respectivamente. Entretanto, no íleo todas as doses administradas induziram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na profundidade das criptas, que foi de 22,65%, 26,07% e 26,74% para os animais que receberam 50, 75 e 100 mg/kg, respectivamente.

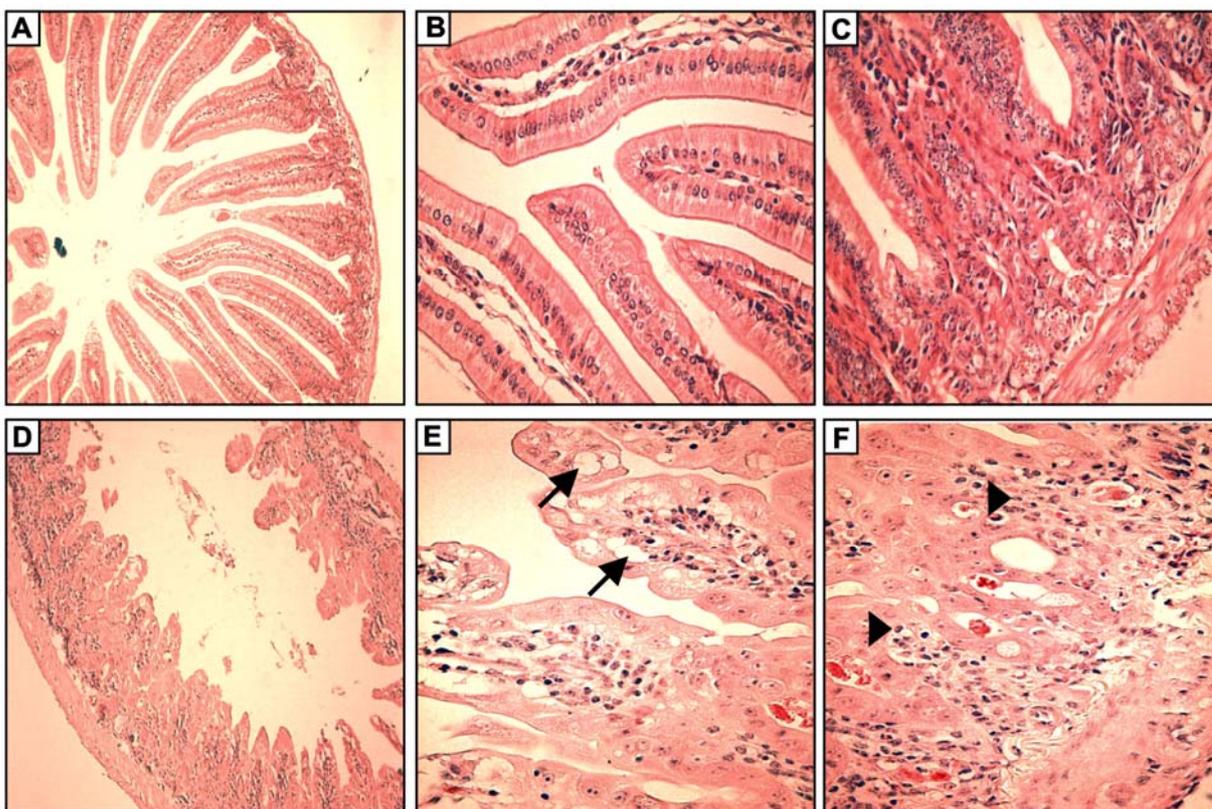


FIGURA 6 – Fotomicrografias da mucosa duodenal de camundongos Swiss normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (A e D – aumento de 100x; B, C, E, F – 400x). Mucosa intestinal de animais normais, não submetidos à mucosite intestinal, mostrando vilos (A, B) e criptas (C) preservados. Mucosa intestinal de animais que receberam CPT-11, mostrando encurtamento dos vilos (D,E), achatamento e vacuolização de enterócitos (seta E), necrose de criptas (F) e infiltrado de células mononucleares (cabeça de seta F).

TABELA 2 – Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na indução de mucosite intestinal em camundongos Swiss.

	CPT-11			
	Salina	50 mg/kg	75 mg/kg	100 mg/kg
Duodeno	0 (0-0)	2 (1-3)	4 (3-4)*	4 (4-4) *
Jejuno	0 (0-0)	1 (1-3)	4 (3-4)*	4 (4-4) *
Íleo	0 (0-0)	4 (2-4)*	4 (4-4)*	4 (4-4) *

Os animais receberam CPT-11 (50, 75 e 100 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. A avaliação histológica foi realizada por escores propostos por Woo *et al.* (2000), onde se tem: 0 – ausência de lesão; 1 – menos de 10% das criptas contêm células necróticas; 2 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta; 3 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (< 20%), os vilos encontram-se encurtados, variável hipertrofia/hiperbasofilia nas criptas remanescentes; 4 – lesões mais extensas que em 3. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

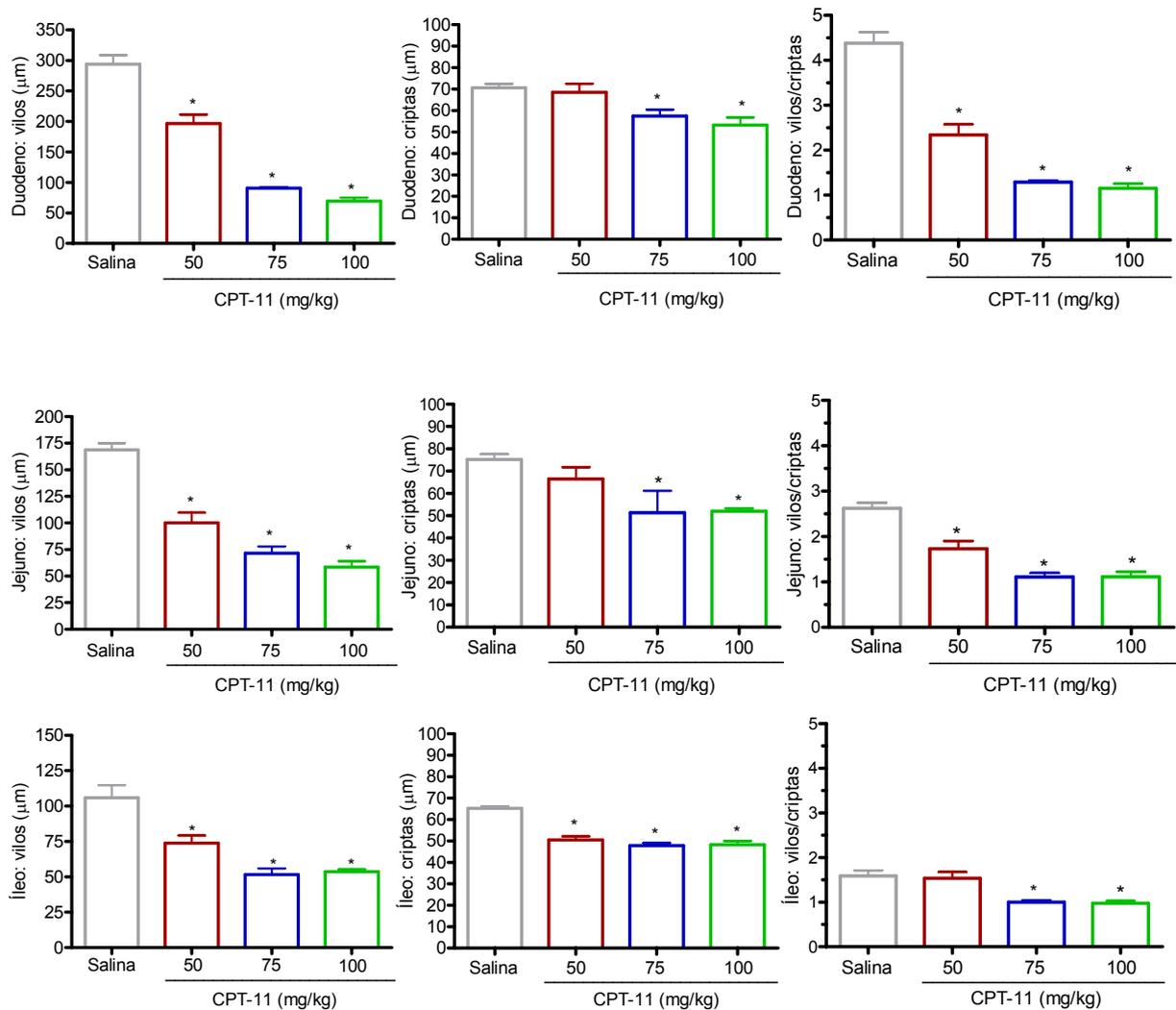


FIGURA 7 – Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na morfometria intestinal de camundongos *Swiss*.

Os animais receberam CPT-11 (50, 75 e 100 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. Os valores representam média  $\pm$  EPM e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

### 3.1.6 Efeito do CPT-11 na atividade de MPO no duodeno

A Figura 8 mostra que o tratamento com CPT-11 nas doses estudadas aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade de MPO no intestino (duodeno), no sétimo dia experimental. Este aumento enzimático expressivo demonstra que este agente quimioterápico provocou infiltração de neutrófilos no intestino.

### 3.1.7 Efeito do CPT-11 nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram o efeito do tratamento com CPT-11 (75 mg/kg) nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC no duodeno de animais sacrificados nos dias 5 e 7. O CPT-11 (75 mg/kg) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de TNF- $\alpha$  de animais sacrificados no quinto e sétimo dias experimentais. Entretanto, as citocinas IL-1 $\beta$  e KC somente apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no sétimo dia experimental.

### 3.1.8 Efeito do CPT-11 na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal

Na Tabela 3 observam-se as graduações das marcações do TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2 pelo estudo imunohistoquímico das mucosas do duodeno de camundongos normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo tratamento com o CPT-11.

Os animais normais apresentaram leve marcação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ao nível do epitélio dos vilos (escore 1; 1-1). No grupo de animais submetidos à mucosite observa-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da marcação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria (escore 4; 4-4 e 4; 3-4, respectivamente). A marcação de IL-1 $\beta$  também foi observada nas células endoteliais (Figura 10).

A mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 provocou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão de iNOS no segmento do duodeno (escore 4; 3-4). Pode-se ver na Figura 11 que a marcação de iNOS encontra-se intensa no epitélio de revestimento e especialmente nas células da lâmina própria, mostrando que houve

aumento na atividade desta enzima no curso da mucosite intestinal. Os animais normais apresentam leve a moderada marcação no epitélio dos vilos (escore 1; 1-2).

Quanto à expressão da COX-2, pode-se verificar na Figura 12, que o tratamento com CPT-11 aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a marcação da COX-2 no epitélio de revestimento e nas criptas (escore 2,5; 2-3). Nos animais normais observam-se leve marcação desta enzima (escore 1;1-1).

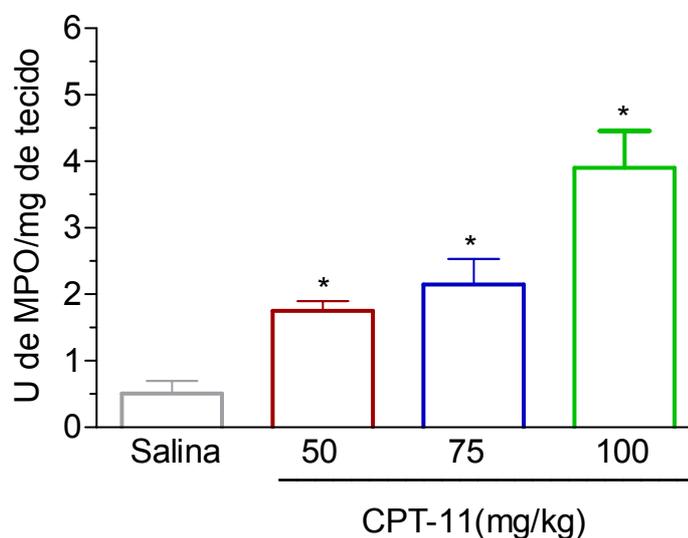


FIGURA 8 – Efeito de diferentes doses do cloridrato de irinotecano (CPT-11) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos Swiss.

Os animais receberam CPT-11 (50, 75 e 100 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e uma porção do duodeno foi congelada no freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A atividade de MPO foi determinada por ensaio colorimétrico, segundo método modificado pelo descrito por Bradley *et al.* (1982). Os valores representam média  $\pm$  EPM da unidade de MPO/mg de tecido e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

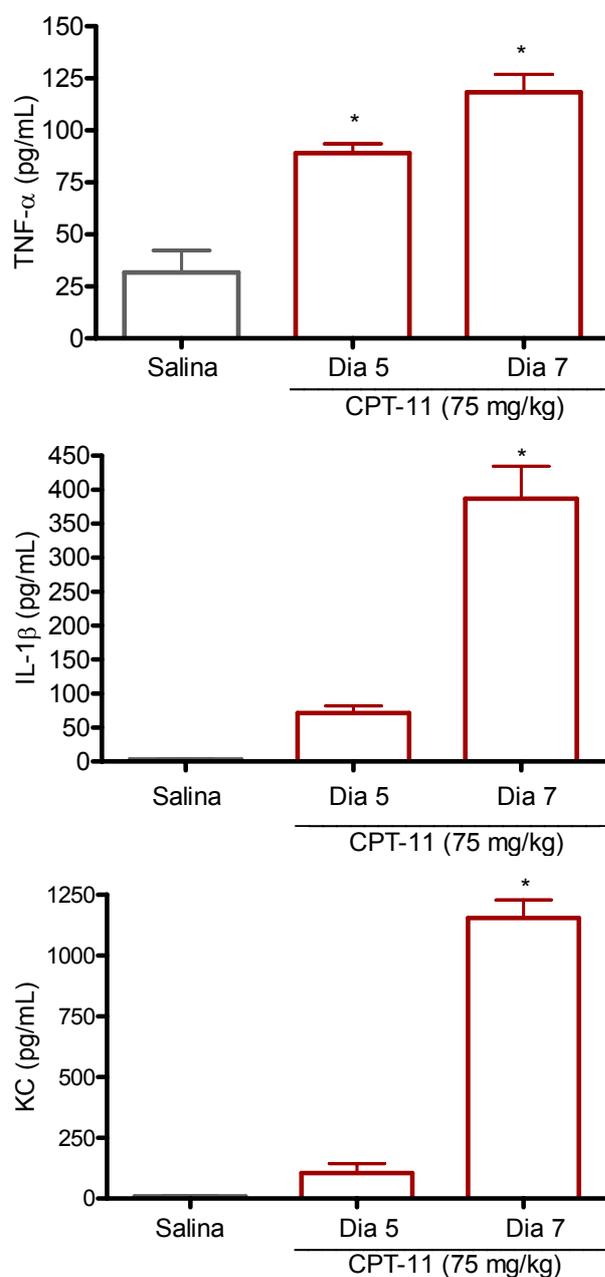


FIGURA 9 – Efeito do cloridrato de irinotecano (CPT-11) nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC) no duodeno de camundongos Swiss.

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no quinto ou sétimo dia experimental, e uma porção do duodeno foi congelada no freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O ensaio foi realizado por ELISA através do método descrito por Cunha *et al.* (1993). Os valores representam média  $\pm$  EPM da quantidade de citocinas (pg/mL) e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo cinco.

TABELA 3 – Efeito do cloridrato de irinotecano (CPT-11) no grau de expressão de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss*.

	Controle negativo	Salina	CPT-11 (75 mg/kg)
TNF- $\alpha$	0 (0-0)	1 (1-1)	4 (4-4) *
IL-1 $\beta$	0 (0-0)	1 (1-1)	4 (3-4) *
iNOS	0 (0-0)	1 (1-2)	4 (3-4)*
COX-2	0 (0-0)	1 (1-1)	2,5 (2-3)*

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , iNOS e COX-2. Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-iNOS e anti-COX-2. O grau de expressão foi avaliado por escores descritos por Yeoh *et al.* (2005), onde se tem: 0 – sem marcação; 1 – leve marcação; 2 – moderada marcação; 3 – moderada a intensa marcação e 4 – intensa marcação. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. \* Diferença estatística comparado aos animais tratados com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo cinco, à exceção do controle negativo (n=1).

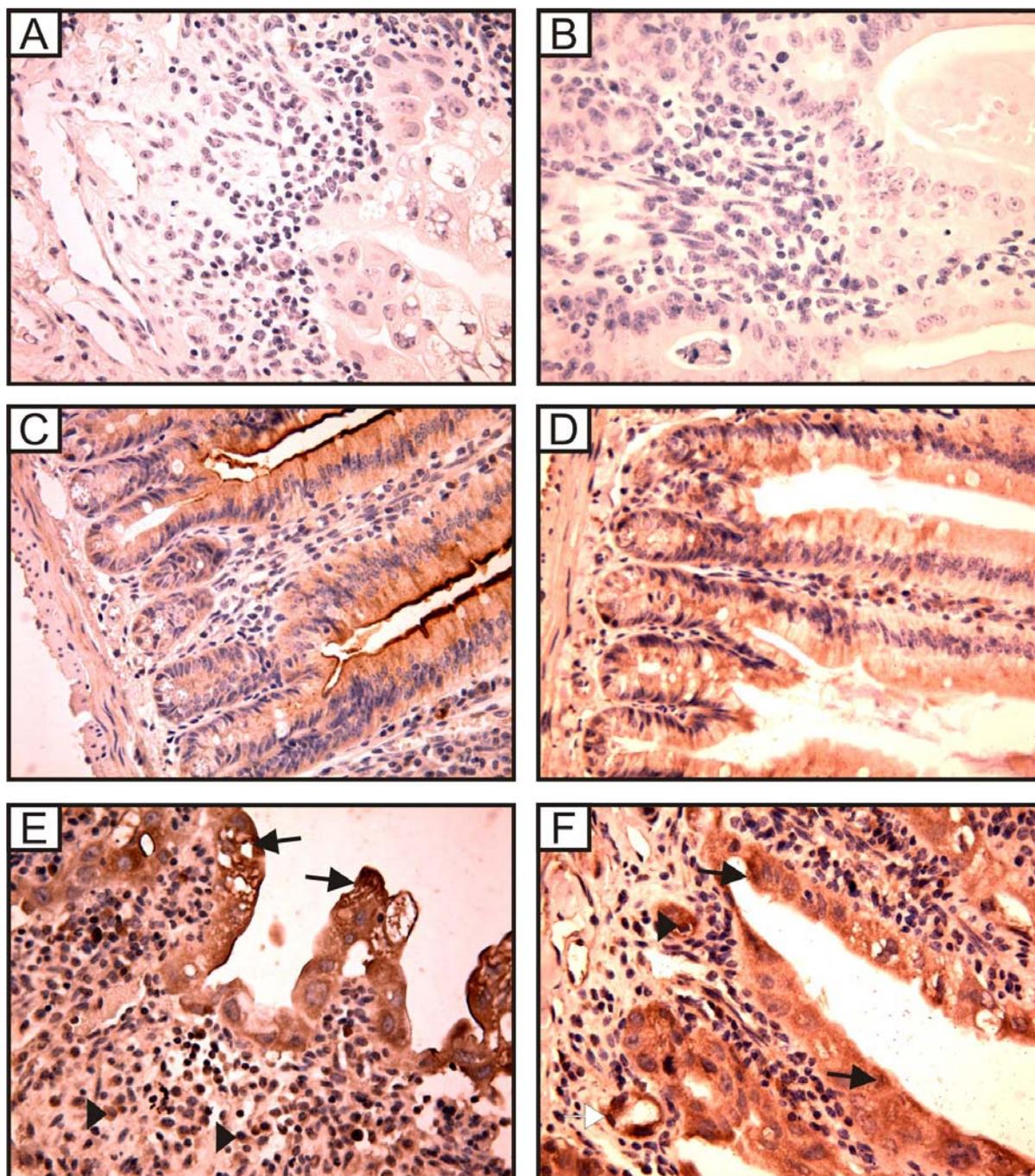


FIGURA 10 – Fotomicrografias da marcação de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$  (A) e anti-IL-1 $\beta$  (B). Duodeno de um animal normal, mostrando leve marcação de TNF- $\alpha$  (C) e IL-1 $\beta$  (D) no epitélio dos vilos. Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando intensa marcação de TNF- $\alpha$  (E) e IL-1 $\beta$  (F) no epitélio de revestimento (seta), células da lâmina própria (cabeça de seta) e do endotélio (seta branca).

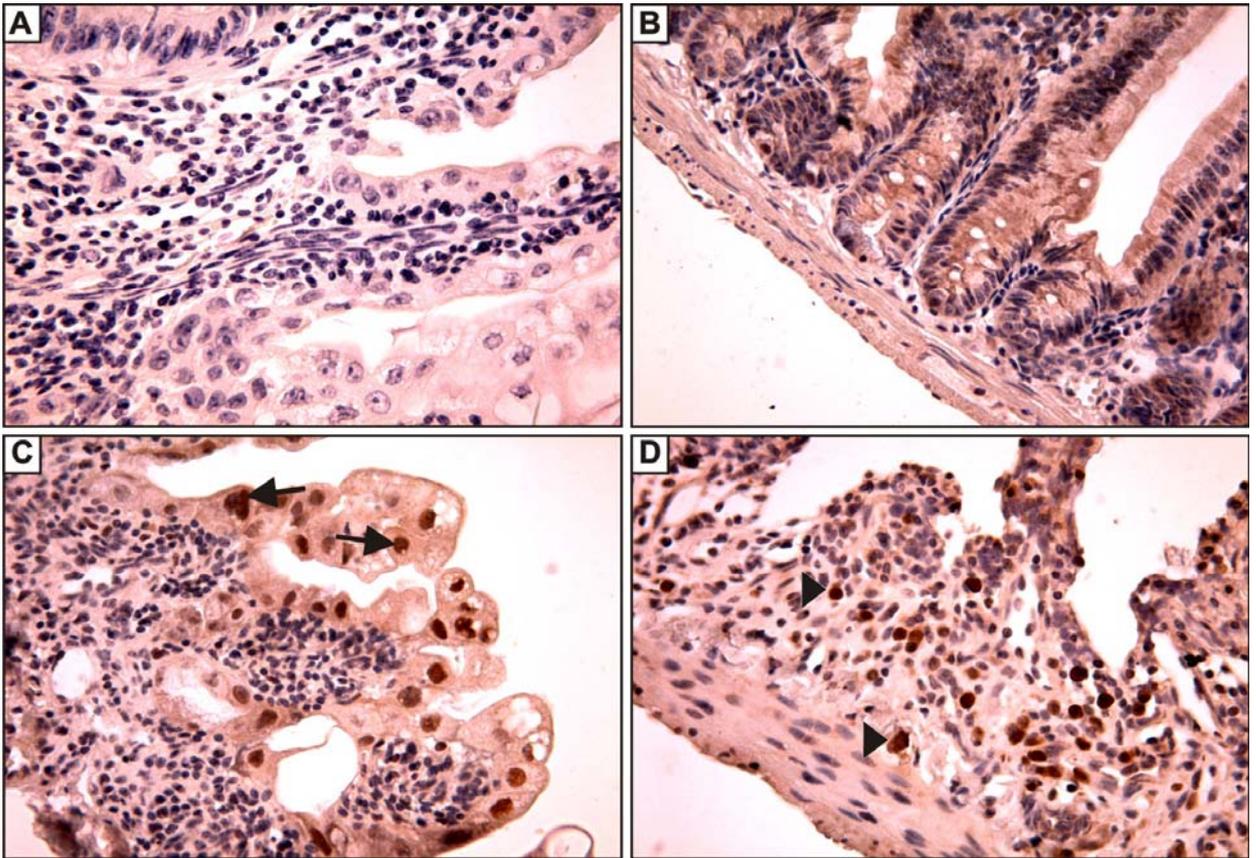


FIGURA 11 – Fotomicrografias da marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* normais e dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de iNOS (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-iNOS (A). Duodeno de um animal normal, mostrando leve a moderada marcação de iNOS no epitélio dos vilos (B). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando intensa marcação de iNOS no epitélio de revestimento (seta C) e nas células da lâmina própria (cabeça de seta D).

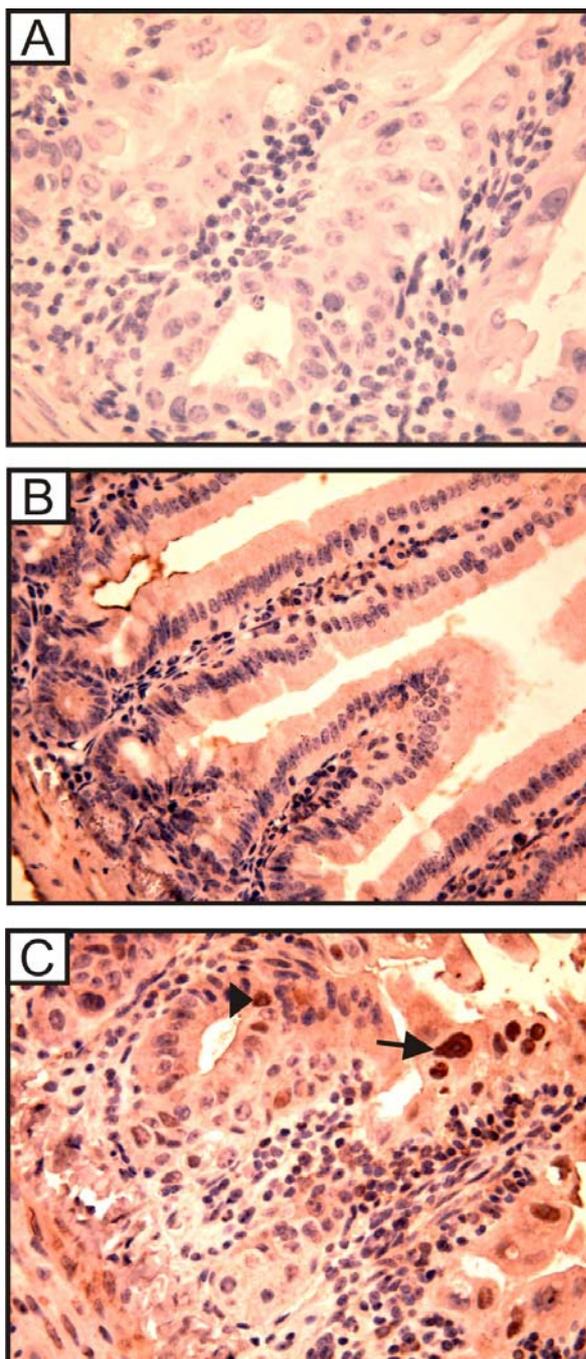


FIGURA 12 – Fotomicrografias da marcação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de camundongos Swiss normais e dos submetidos por mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de COX-2 (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-COX-2 (A). Duodeno de um animal normal, mostrando leve marcação de COX-2, principalmente nas criptas (B). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando moderada a intensa marcação de COX-2 no epitélio de revestimento (seta C) e nas criptas (cabeça de seta C).

### **3.2 Efeito do tratamento com PTX na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11**

#### **3.2.1 Efeito da PTX na severidade da diarreia induzida pelo CPT-11**

A Tabela 4 mostra o efeito da PTX, nas doses de 1,7, 5 e 15 mg/kg, na severidade da diarreia induzida pelo CPT-11. A droga foi administrada durante sete dias consecutivos, iniciando-se o tratamento um dia antes da indução da mucosite intestinal com o CPT-11. Os resultados demonstram que a PTX nas menores doses (1,7 e 5 mg/kg) reduziu significativamente a gravidade da diarreia induzida por CPT-11 no sétimo dia experimental ( $p < 0,05$ ). No sexto dia, apesar de não ser verificada diferença estatística, observa-se uma tendência para melhora do quadro diarreico.

#### **3.2.2 Efeito da PTX na variação da massa corpórea de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11**

Os dados apresentados na Figura 13 demonstram que a PTX em nenhuma dose reverteu a perda de massa corpórea nos animais com mucosite intestinal induzida pela administração de CPT-11 ( $p > 0,05$ ), quando administrada no modelo proposto, ou seja, por sete dias, sendo iniciada a primeira dose um dia antes do CPT-11.

#### **3.2.3 Efeito da PTX no leucograma de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11**

A Figura 14 mostra que o tratamento durante sete dias com a PTX, nas doses de 1,7, 5 e 15 mg/kg, não alterou ( $p > 0,05$ ) as contagens do número de leucócitos totais no sangue periférico dos animais submetidos à mucosite intestinal induzida pela administração de quatro dias consecutivos de CPT-11.

### 3.2.4 Efeito da PTX na sobrevida de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

A Figura 15 mostra que a PTX, nas doses de 1,7, 5 e 15 mg/kg, não alterou significativamente ( $p > 0,05$ ) a sobrevida dos animais com mucosite intestinal provocada pelo CPT-11. Sobrevida de 90% foi observada no grupo que recebeu 5 mg/kg, seguida pelo grupo tratado com PTX 1,7mg/kg, que teve sobrevida de 87,5%. Por outro lado, o grupo em que a PTX foi administrada em maior dose (15mg/kg) apresentou sobrevida de 80%, enquanto o grupo não tratado com a PTX teve sobrevida de 75%.

TABELA 4 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) na severidade da diarreia induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*.

<b>CPT-11 (75 mg/kg)</b>					
<b>PTX (mg/kg)</b>					
<b>Dia</b>	<b>Normal</b>	<b>Salina</b>	<b>1,7</b>	<b>5</b>	<b>15</b>
1 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-1)
2 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)
3 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
4 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-2)
5 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)
6 <sup>o</sup>	0 (0-0)	3 (0-3)#	1 (0-3)	1 (0-2)	2 (0-3)
7 <sup>o</sup>	0 (0-0)	3 (0-3)#	0 (0-3)*	0 (0-3)*	2 (0-3)

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5, 15 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. A diarreia foi avaliada por escores propostos por Kurita *et al.* (2000), onde se tem: 0 – normal, ausência de diarreia; 1 – diarreia leve, fezes levemente umedecidas; 2 – diarreia moderada, fezes sem formas com presença de quantidade moderada de sujidades na região perianal; e 3 – diarreia grave, fezes aquosas com grande quantidade de sujidades na região perianal. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

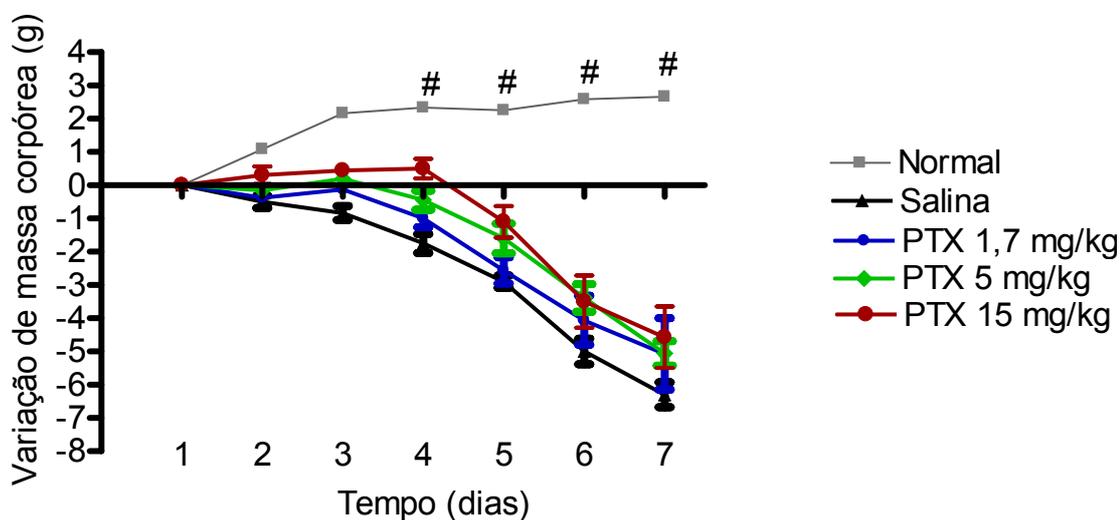


FIGURA 13 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) na variação da massa corpórea em camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5, 15 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. As massas corpóreas foram avaliadas diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam média  $\pm$  EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas corpóreas obtidas diariamente e a inicial. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais com mucosite intestinal tratados com salina e PTX ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

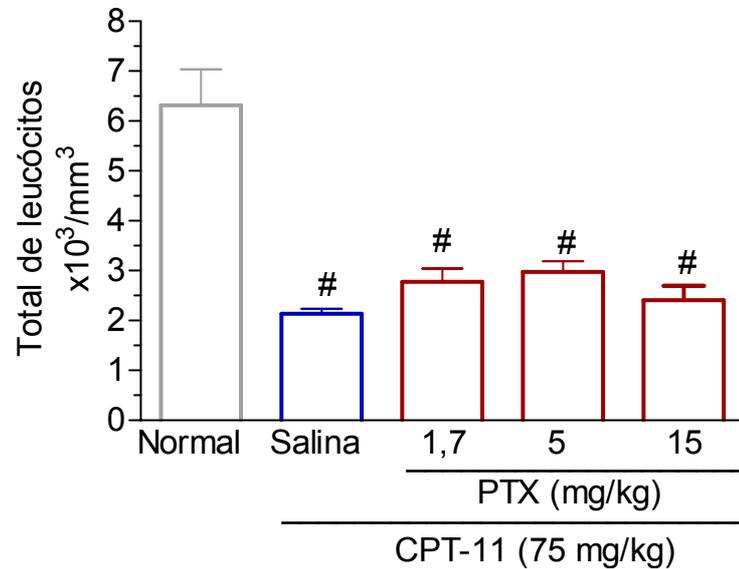


FIGURA 14 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) no leucograma de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5 e 15 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. O sangue foi colhido por punção na artéria ocular imediatamente antes do sacrifício e a contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, conforme descrito por Moura *et al.* (1998). Os valores representam média  $\pm$  EPM do número total de leucócitos  $\times 10^3/\text{mm}^3$  e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

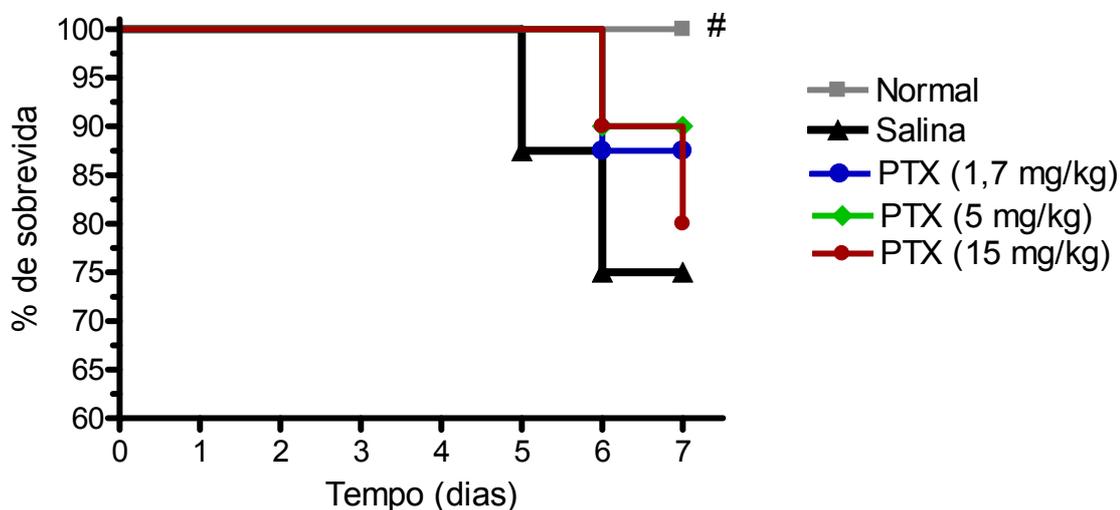


FIGURA 15 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) na curva de sobrevivência de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida por cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5 e 15 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. As taxas de sobrevivência foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de logrank. # Diferença estatística comparado aos animais com mucosite intestinal tratados com salina e PTX ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo dez.

### 3.2.5 Efeito da PTX nas estruturas histológicas do intestino de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

O tratamento com a PTX, nas doses de 1,7 e 5 mg/kg durante sete dias consecutivos, com início um dia da indução da mucosite, melhorou a estrutura histológica dos animais tratados com o CPT-11, ou seja, reduziu o encurtamento dos vilos, aumentou a profundidade das criptas e reduziu o infiltrado de células mononucleares na lâmina própria nos animais submetidos à mucosite intestinal (Figuras 16).

Quando se utilizou o escore histológico (Woo *et al.*, 2000) para classificar as lesões intestinais verificou-se que a PTX na dose de 1,7 mg/kg, administrada por sete dias, reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a destruição provocada pelo uso do CPT-11 no duodeno, jejuno e íleo. Já, a administração de PTX 5 mg/kg melhorou significativamente ( $p < 0,05$ ) apenas as estruturas histológicas da porção duodenal e jejunal. No entanto, a PTX (15 mg/kg) não reverteu significativamente ( $p > 0,05$ ) as alterações histológicas induzidas pelo CPT-11 de nenhum segmento intestinal (Tabela 5).

Os resultados da análise morfométrica do intestino de animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11 tratados e não-tratados com a PTX podem ser observados na Figura 17, onde se observa que a PTX nas doses utilizadas aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a profundidade das criptas intestinais nos segmentos duodenal e jejunal em média em 82,82% e 47,88%, respectivamente. Por outro lado, no íleo apenas a menor dose (1,7 mg/kg) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a destruição das criptas induzidas pelo CPT-11 em 53,29%, apesar de se verificar uma tendência de melhora com as outras doses. Em relação à altura dos vilos, observou-se que no duodeno a PTX nas doses de 1,7 e 5 mg/kg reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o encurtamento em 77,7 e 62,65%, respectivamente. Assim, a PTX parece ter um papel protetor das lesões induzidas por CPT-11.

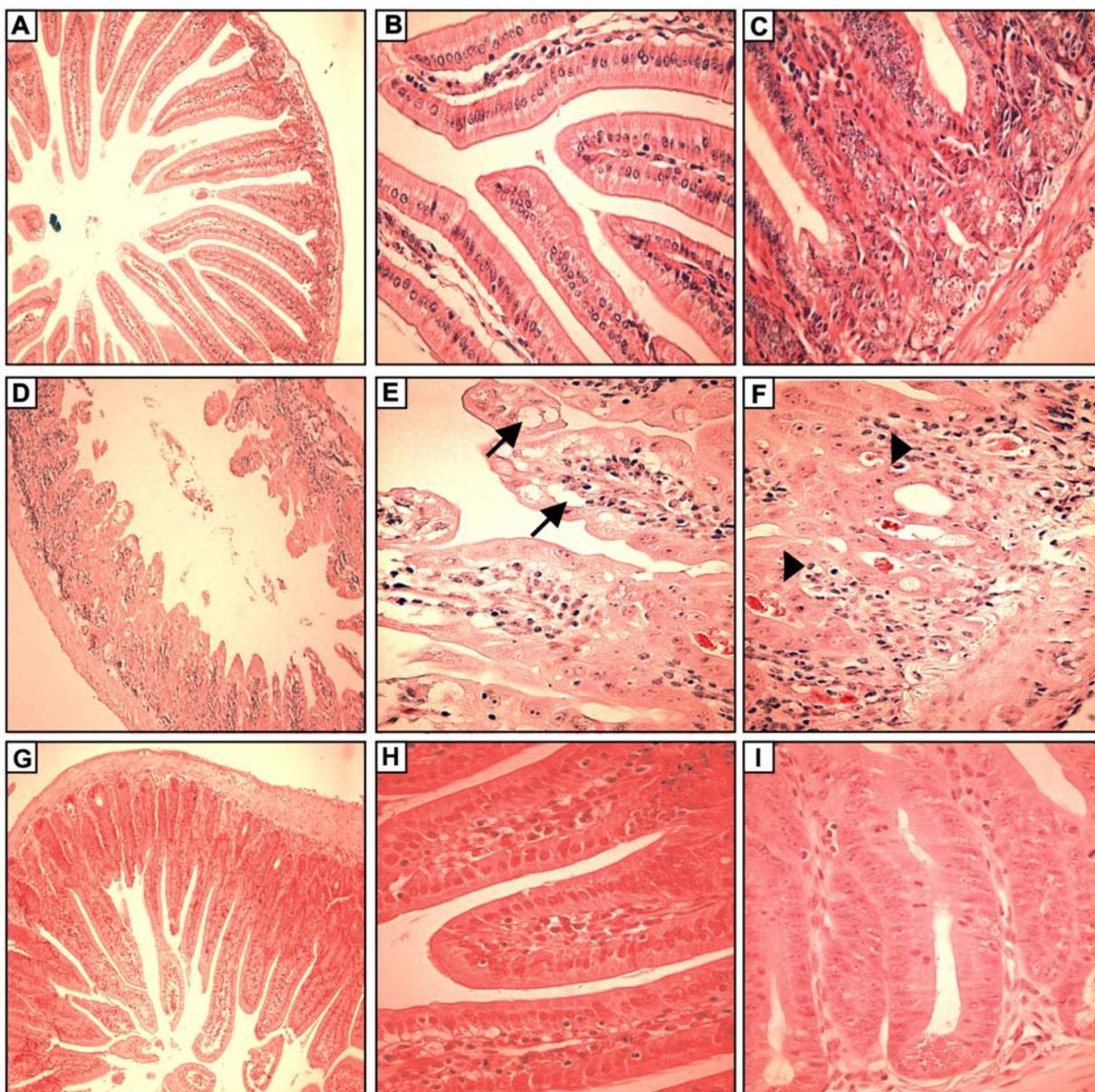


FIGURA 16 – Fotomicrografias da mucosa duodenal de camundongos Swiss normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com pentoxifilina (PTX).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p). A PTX (1,7 mg/kg) ou solução salina 0,9% foi administrada durante sete dias (s.c.), iniciando um dia antes do CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (A, D e G – aumento de 100x; B, C, E, F, H, I – 400x). Mucosa intestinal de animais normais, não submetidos à mucosite intestinal, mostrando vilos (A, B) e criptas (C) preservados. Mucosa intestinal de animais que receberam CPT-11, mostrando encurtamento dos vilos (D, E), achatamento e vacuolização de enterócitos (seta E), necrose de criptas (F) e infiltrado de células mononucleares na lâmina própria (cabeça de seta F). Mucosa intestinal de animais que receberam CPT-11 e PTX, mostrando menor encurtamento dos vilos (G, H), aumento da profundidade das criptas, menor infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria (I).

TABELA 5 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) no grau de mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos Swiss.

	CPT-11 (75 mg/kg)				
	Normal	Salina	PTX (mg/kg)		
			1,7	5	15
Duodeno	0 (0-0)	4 (3-4)#	1 (0-4)*	2 (0-3)*	3 (1-4)
Jejuno	0 (0-0)	4 (4-4)#	2 (0-4)*	2 (0-4)*	4 (0-4)#
Íleo	0 (0-0)	4 (4-4)#	2 (1-4)*	4 (3-4)#	4 (3-4)#

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5, 15 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. A avaliação histológica foi realizada por escores propostos por Woo *et al.* (2000), onde se tem: 0 – ausência de lesão; 1 – menos de 10% das criptas contêm células necróticas; 2 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta; 3 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (< 20%), os vilos encontram-se encurtados, variável hipertrofia/hiperbasofilia nas criptas remanescentes; 4 – lesões mais extensas que em 3. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

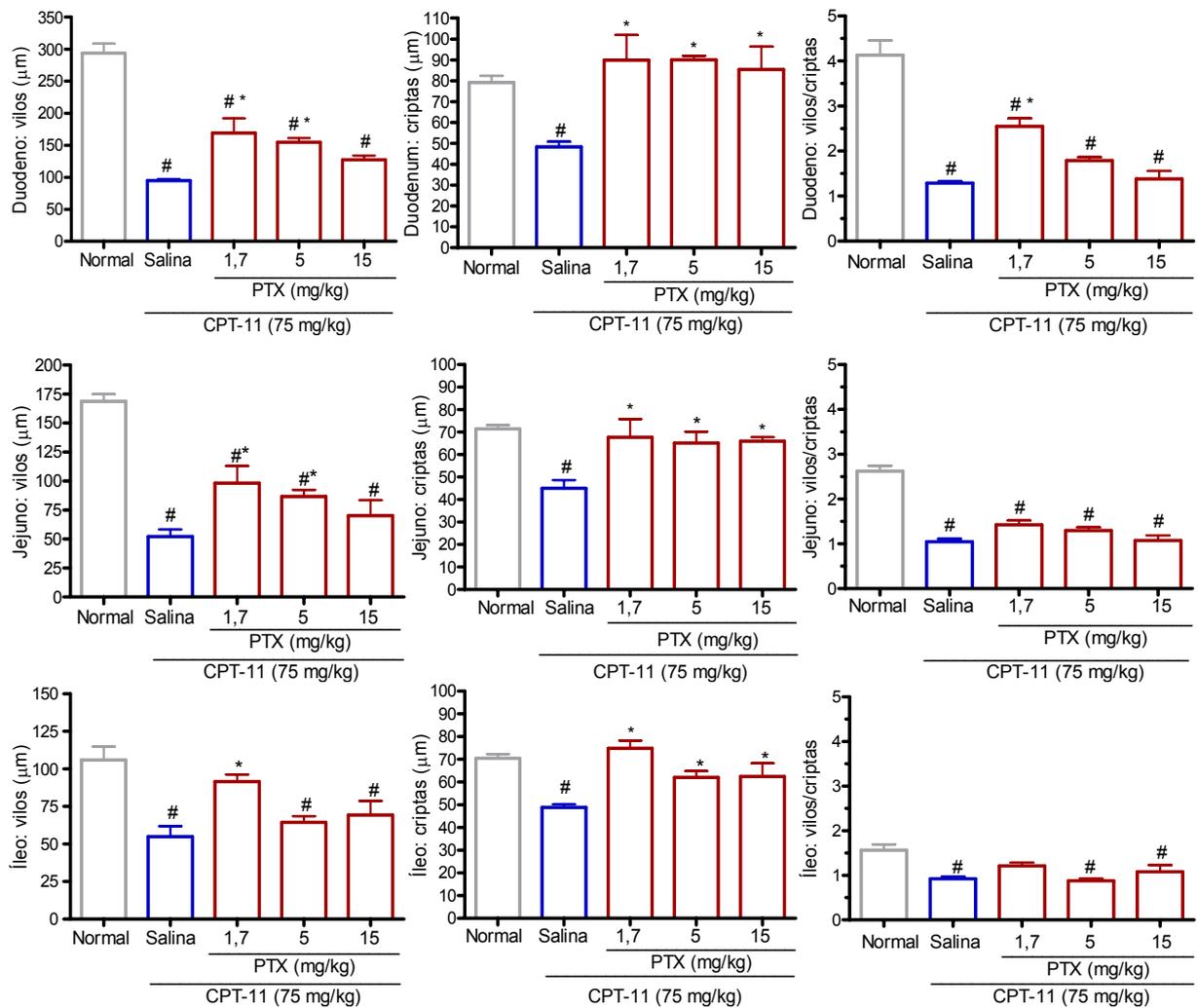


FIGURA 17 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) nas alterações morfológicas intestinais induzidas pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*.

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5 e 15 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. Os valores representam média  $\pm$  EPM e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

### 3.2.6 Efeito da PTX na atividade de MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Através dos dados mostrados na Figura 18, verifica-se que o tratamento com PTX (1,7, 5 e 15 mg/kg) foi capaz de reduzir de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a atividade da MPO no duodeno. Portanto, a PTX preveniu a migração neutrofílica na lesão intestinal observada na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.

### 3.2.7 Efeito da PTX nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

O tratamento com PTX (1,7 mg/kg) reverteu significativamente ( $p < 0,05$ ) o aumento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC na mucosa duodenal nos animais submetidos à mucosite intestinal pela administração de CPT-11 (Figura 19).

### 3.2.8 Efeito da PTX na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Na Tabela 6 observa-se o efeito da PTX (1,7 mg/kg) no grau de marcação de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal.

As Figuras 20E e 20F mostram o duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, onde se vê marcações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ao nível do epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria, mostrando um aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão destas citocinas (escore 4; 4-4 e 4; 3-4). Nas fotomicrografias 20G e 20H, pode-se observar uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na marcação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  tanto ao nível do epitélio de revestimento como na lâmina própria (escores 2; 2-3) nos animais tratados com PTX.

As Figuras 21C e 21D mostram o duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 apresentando forte marcação de iNOS ao nível do epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria (escore 4; 3-4). A PTX reduziu ( $p < 0,05$ ) a marcação de iNOS no epitélio de revestimento, e especialmente nas células da lâmina própria (escore 1,5; 1-2) (Figura 21E).

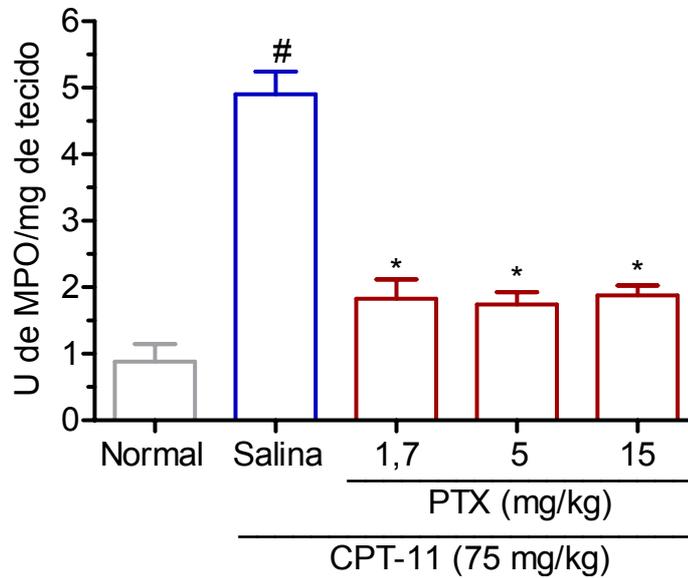


FIGURA 18 – Efeito de diferentes doses da pentoxifilina (PTX) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos Swiss com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7, 5 e 15 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e uma porção do duodeno foi congelada em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A atividade de MPO foi determinada por ensaio colorimétrico, segundo método modificado pelo descrito por Bradley *et al.* (1982). Os valores representam média  $\pm$  EPM da unidade de MPO/mg de tecido e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

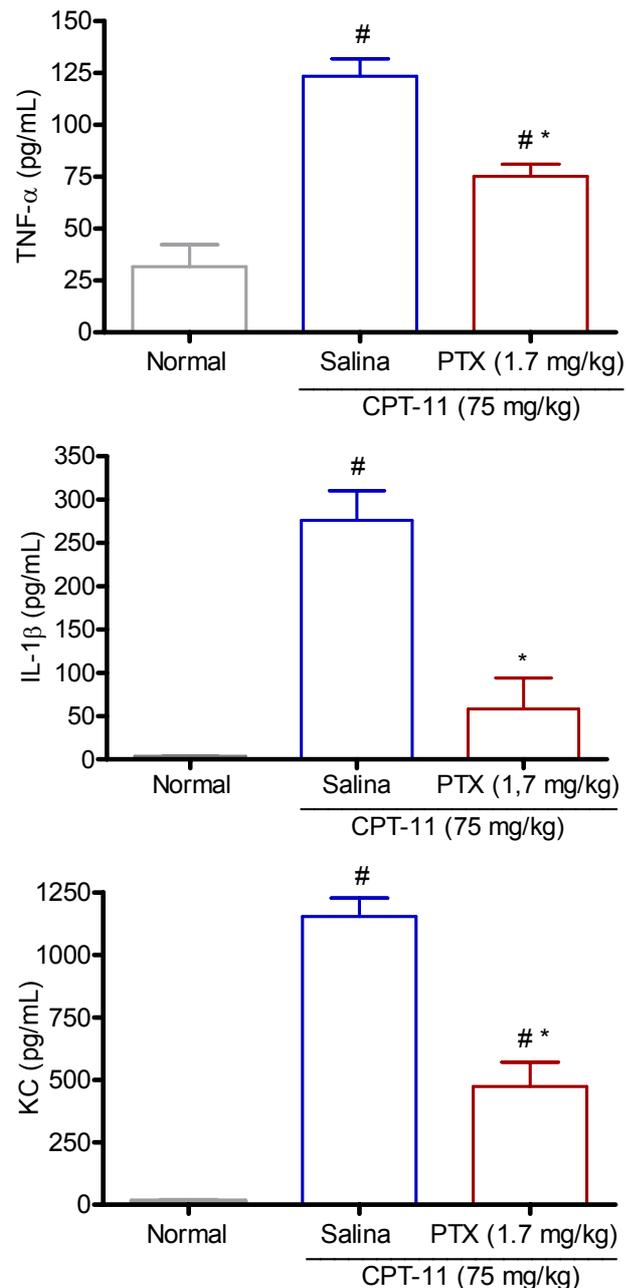


FIGURA 19 – Efeito da pentoxifilina (PTX) nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC) no duodeno de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e uma porção do duodeno foi congelada no freezer a -70°C. O ensaio foi realizado por ELISA através do método descrito por Cunha *et al.* (1993). Os valores representam média  $\pm$  EPM da quantidade de citocinas (pg/mL) e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo cinco.

TABELA 6 – Efeito da pentoxifilina (PTX) no grau de expressão de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

	CPT-11 (75 mg/kg)			
	Controle negativo	Normal	Salina	PTX (1,7 mg/kg)
TNF- $\alpha$	0 (0-0)	1 (1-1)	4 (4-4) <sup>#</sup>	2 (2-3) <sup>*</sup>
IL-1 $\beta$	0 (0-0)	1 (1-1)	4 (3-4) <sup>#</sup>	2 (2-3) <sup>*</sup>
iNOS	0 (0-0)	1 (1-2)	4 (3-4) <sup>#</sup>	1,5 (1-2) <sup>*</sup>

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam PTX (1,7 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS. Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  e anti-iNOS. O grau de expressão foi avaliado por escores descritos por Yeoh *et al.* (2005), onde se tem: 0 – sem marcação; 1 – leve marcação; 2 – moderada marcação; 3 – moderada a intensa marcação e 4 – intensa marcação. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo cinco, à exceção do controle negativo (n=1).

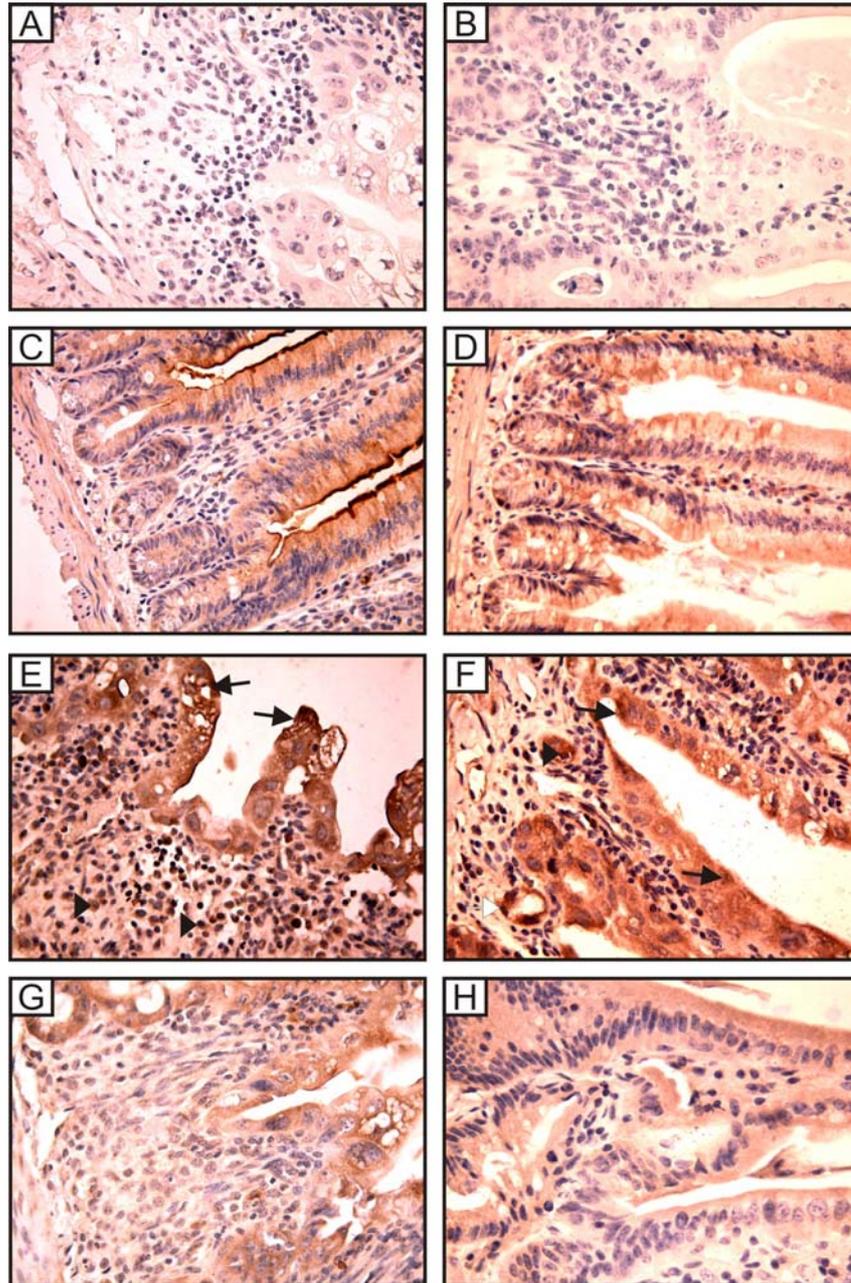


FIGURA 20 – Fotomicrografias da marcação de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com pentoxifilina (PTX).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). PTX (1,7 mg/kg) ou solução salina 0,9% foi administrada durante sete dias (s.c.), iniciando um dia antes do CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$  (A) e anti-IL-1 $\beta$  (B). Duodeno de um animal normal, mostrando leve marcação de TNF- $\alpha$  (C) e IL-1 $\beta$  (D) no epitélio dos vilos. Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando intensa marcação de TNF- $\alpha$  (E) e IL-1 $\beta$  (F) no epitélio de revestimento (seta), células da lâmina própria (cabeça de seta) e do endotélio (seta branca). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal tratado com PTX, mostrando a redução na marcação de TNF- $\alpha$  (G) e IL-1 $\beta$  (H) ao nível no epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria.

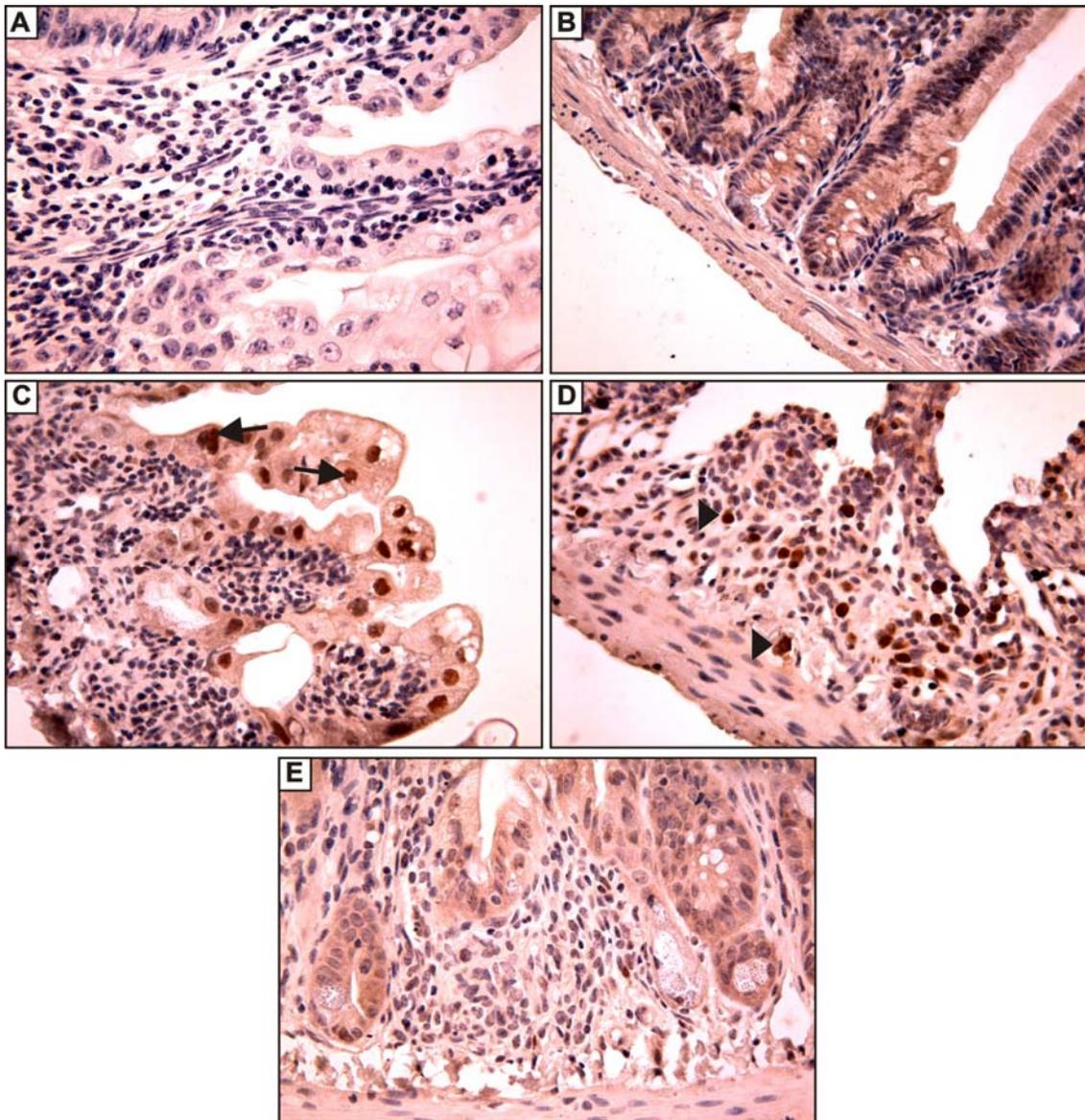


FIGURA 21 – Fotomicrografias da marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com pentoxifilina (PTX).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). A PTX (1,7 mg/kg) ou solução salina 0,9% foi administrada durante sete dias (s.c.), iniciando um dia antes do CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de iNOS (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-iNOS (A). Duodeno de um animal normal, mostrando marcação leve a moderada de iNOS no epitélio dos vilos (B). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando intensa marcação de iNOS no epitélio de revestimento (seta C) e nas células da lâmina própria (cabeça de seta D). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal tratado com PTX, mostrando a redução na marcação de iNOS no epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria (E).

### 3.3 Efeito do tratamento com TLD na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

#### 3.3.1 Efeito da TLD na severidade da diarreia induzida pelo CPT-11

Pode-se observar na Tabela 7 que o tratamento durante sete dias com TLD (15, 30 e 60 mg/kg) não reverteu significativamente ( $p > 0,05$ ) a diarreia induzida pelo CPT-11.

#### 3.3.2 Efeito da TLD na variação da massa corpórea de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

A Figura 22 demonstra que a TLD, nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg, por sete dias consecutivos, não reduziu de forma estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), a perda de peso dos animais com mucosite intestinal experimental induzida pelo CPT-11.

#### 3.3.3 Efeito da TLD no leucograma de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Na Figura 23 pode-se observar que o tratamento durante sete dias com TLD, nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg (s.c.) não foi capaz de alterar a contagem total de leucócitos no sangue de animais submetidos à mucosite intestinal experimental com CPT-11 ( $p > 0,05$ ).

#### 3.3.4 Efeito da TLD na sobrevida de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

O tratamento com TLD durante sete dias consecutivos, não foi capaz de reduzir a mortalidade de animais submetidos à mucosite intestinal induzida por CPT-11 ( $p > 0,05$ ). Os grupos tratados com salina e TLD (15 mg/kg) apresentaram taxa de sobrevida de 70% e os grupos em que foram administrados TLD 30 e 60mg/kg tiveram sobrevida de 60% e 66,67%, respectivamente (Figura 24).

TABELA 7 – Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na severidade da diarreia induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*.

<b>CPT-11 (75 mg/kg)</b>					
<b>Dia</b>	<b>Normal</b>	<b>Salina</b>	<b>TLD (mg/kg)</b>		
			<b>15</b>	<b>30</b>	<b>60</b>
1 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)
2 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
3 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)
4 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-3)
5 <sup>o</sup>	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)
6 <sup>o</sup>	0 (0-0)	3 (0-3)#	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)
7 <sup>o</sup>	0 (0-0)	3 (2-3)#	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (15, 30 e 60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. A diarreia foi avaliada por escores propostos por Kurita *et al.* (2000), onde se tem: 0 – normal, ausência de diarreia; 1 – diarreia leve, fezes levemente umedecidas; 2 – diarreia moderada, fezes sem formas com presença de quantidade moderada de sujidades na região perianal; e 3 – diarreia grave, fezes aquosas com grande quantidade de sujidades na região perianal. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

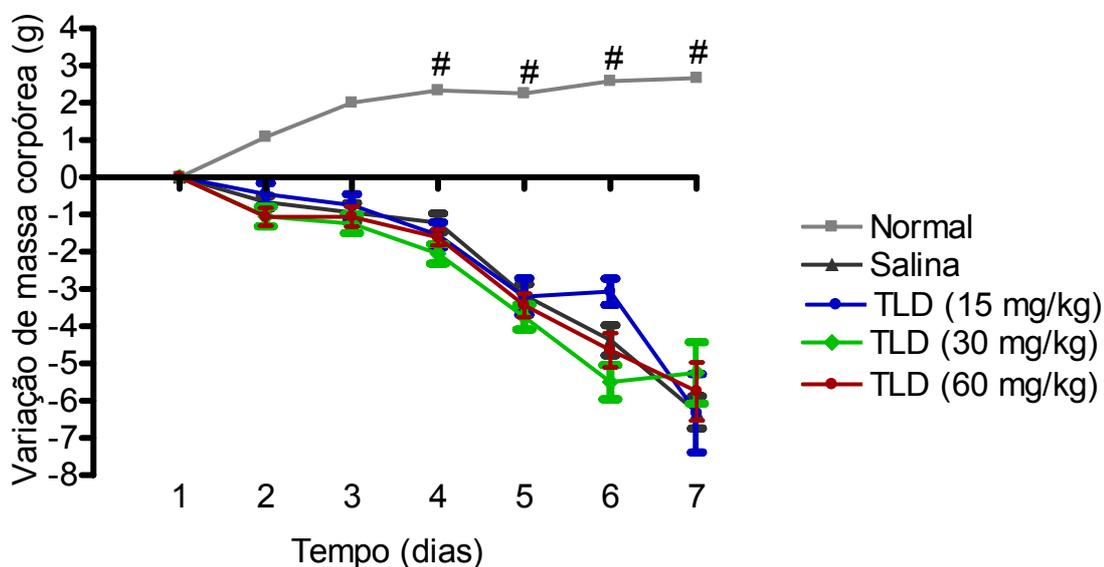


FIGURA 22 – Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na variação da massa corpórea em camundongos Swiss com mucosite intestinal induzida por cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (15, 30 e 60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. As massas corpóreas foram avaliadas diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam média  $\pm$  EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas corpóreas obtidas diariamente e a inicial. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais com mucosite intestinal tratados com salina e TLD ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

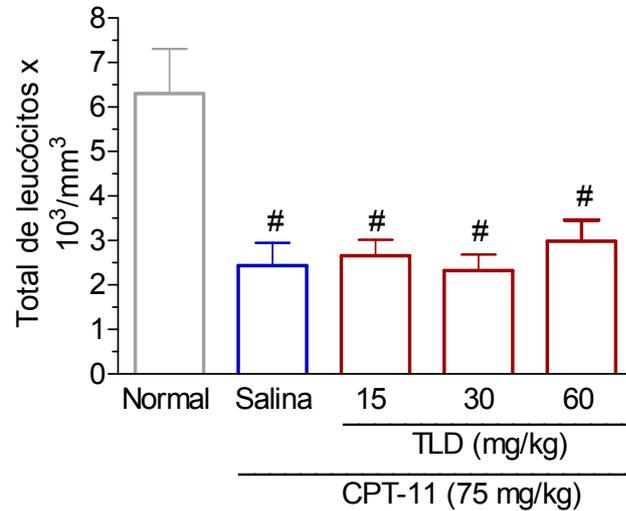


FIGURA 23 – Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) no leucograma de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (15, 30 e 60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. O sangue foi colhido por punção na artéria ocular imediatamente antes do sacrifício e a contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, conforme descrito por Moura *et al.* (1998). Os valores representam média  $\pm$  EPM do número total de leucócitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

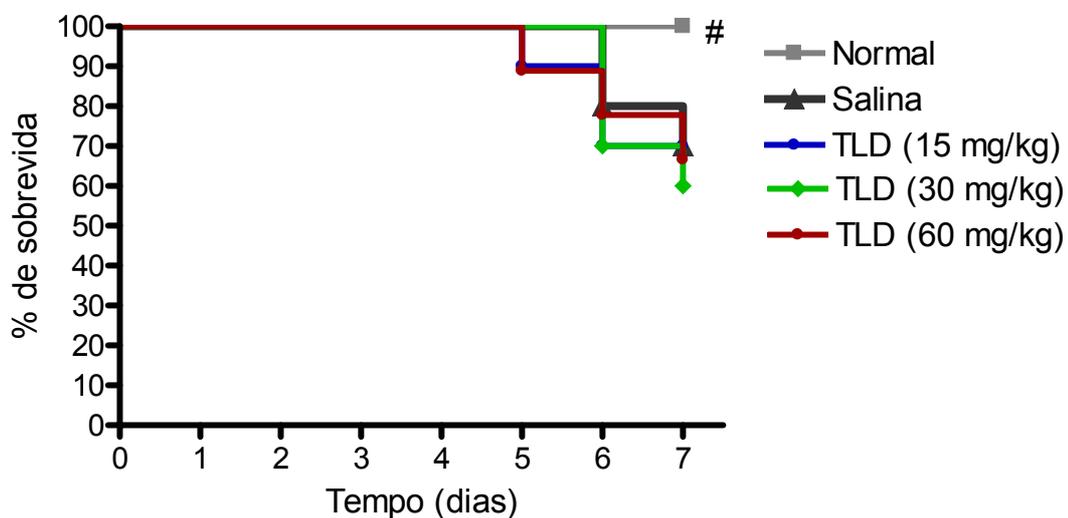


FIGURA 24 – Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na curva de sobrevivida de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida por cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (15, 30 e 60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. As taxas de sobrevivida foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de logrank. # Diferença estatística comparado aos animais com mucosite intestinal tratados com salina e TLD ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo dez.

### 3.3.5 Efeito da TLD nas estruturas histológicas do intestino de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

A Figura 25 e a Tabela 8 mostram o grau de mucosite intestinal de camundongos *Swiss* submetidos à mucosite intestinal induzido pelo CPT-11 tratados com TLD nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg (s.c.) durante sete dias. Os resultados demonstram que o tratamento com TLD na maior dose (60 mg/kg) preveniu o surgimento das lesões intestinais induzidas pelo CPT-11 apenas no segmento duodenal ( $p < 0,05$ ) quantificadas pelo critério de Woo *et al.* (2000).

Quando se fez a análise quantitativa dos vilos e criptas através da morfometria observou-se que apenas a maior dose mostrou proteger as criptas do segmento duodenal da destruição induzida pelo CPT-11 ( $p < 0,05$ ). No jejuno e íleo nenhuma dose foi capaz de reverter significativamente ( $p > 0,05$ ) o achatamento dos vilos e a destruição das criptas induzida pelo tratamento quimioterápico (Figura 26).

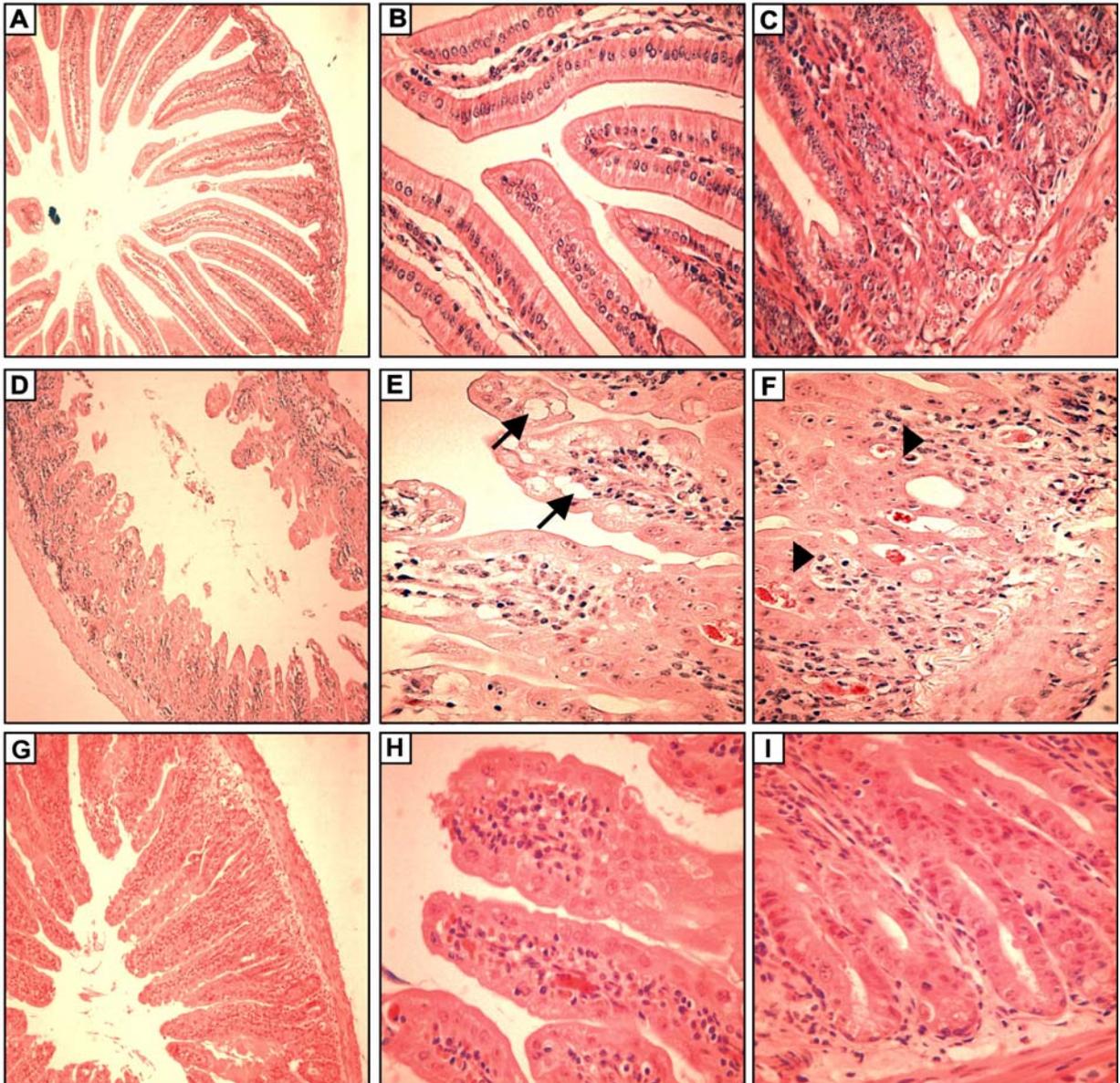


FIGURA 25 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos *Swiss* normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com talidomida (TLD).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p.). A TLD (60 mg/kg) ou solução salina 0,9% foi administrada durante sete dias (s.c.), iniciando um dia antes do CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (A, D e G – 100x; B, C, E, F, H, I – 400x). Mucosa intestinal de animais normais, não submetidos à mucosite intestinal, mostrando vilos (A, B) e criptas. (C) preservados. Mucosa intestinal de animais que receberam CPT-11, mostrando encurtamento dos vilos (D, E), achatamento e vacuolização de enterócitos (seta E), necrose de criptas (F) e infiltrado de células mononucleares (cabeça de seta F). Mucosa intestinal de animais que receberam CPT-11 e TLD, mostrando menor encurtamento dos vilos (G, H), aumento da profundidade das criptas e menor infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria (I).

TABELA 8 – Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) no grau de mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*

	CPT-11 (75 mg/kg)				
	Normal	Salina	TLD (mg/kg)		
			15	30	60
Duodeno	0 (0-0)	4 (4-4) <sup>#</sup>	2(1-4)	2 (1-4)	1 (1-4)*
Jejuno	0 (0-0)	4 (3-4) <sup>#</sup>	4 (1-4) <sup>#</sup>	3 (1-4)	3 (1-4)
Íleo	0 (0-0)	4 (4-4) <sup>#</sup>	2 (1-4)	4 (1-4) <sup>#</sup>	4 (1-4) <sup>#</sup>

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (15, 30 e 60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. A avaliação histológica foi realizada por escala de escores proposta por Woo *et al.* (2000), onde se tem: 0 – ausência de lesão; 1 – menos de 10% das criptas contêm células necróticas; 2 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta; 3 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (< 20%), os vilos encontram-se encurtados, variável hipertrofia/hiperbasofilia nas criptas remanescentes; 4 – lesões mais extensas que em 3. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

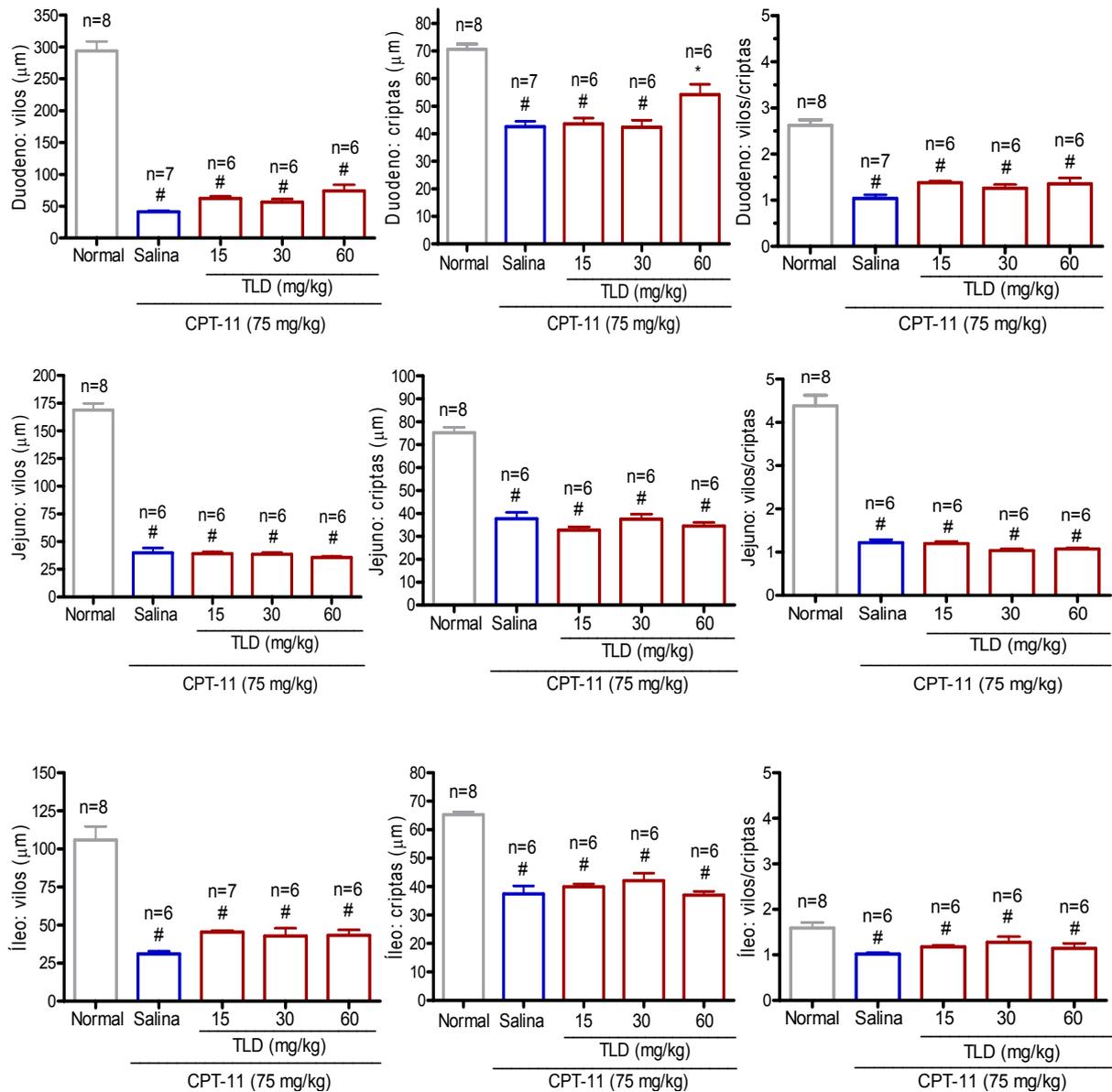


FIGURA 26 – Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) nas alterações morfológicas intestinais induzidas pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*.

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (15, 30 e 60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. Os valores representam média  $\pm$  EPM e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

### 3.3.6 Efeito da TLD na atividade de MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

A Figura 27 mostra o efeito da administração durante sete dias de TLD (15, 30 e 60 mg/kg) na atividade de MPO nos animais com mucosite intestinal induzida por CPT-11. Observou-se que a TLD foi capaz de inibir significativamente ( $p < 0,05$ ) a ativação de MPO no intestino (duodeno), o que demonstra que no grupo tratado com esta droga houve uma menor infiltração de neutrófilos, o que talvez explique em parte o efeito positivo da TLD nas lesões intestinais.

### 3.3.7 Efeito da TLD nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e KC) no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Na Figura 28 observa-se que o tratamento durante sete dias com TLD (60 mg/kg) reverteu significativamente ( $p < 0,05$ ) o aumento de TNF- $\alpha$  na mucosa intestinal nos animais submetidos à mucosite intestinal induzida pelo CPT-11. Por outro lado, a TLD falhou em reduzir os níveis de IL-1 $\beta$  e KC nos animais com mucosite intestinal e sacrificados no sétimo dia experimental.

### 3.3.8 Efeito da TLD na expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ ) e de enzimas (iNOS e COX-2) na mucosa duodenal de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Na Tabela 11 e na Figura 29 observam-se o resultado do efeito da TLD (60 mg/kg) na marcação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. As fotomicrografias 29E e 29F mostram o duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal e tratado com salina, onde se vê além das marcações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  ao nível do epitélio de revestimento, marcações nas células da lâmina própria, mostrando assim, um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão destas citocinas no processo inflamatório (escore 4; 4-4). Na fotomicrografia 29G pode-se observar uma redução evidente do TNF- $\alpha$  tanto ao nível do epitélio de revestimento como também na lâmina própria (escore 2; 1-3), entretanto, confirmou-se por esta técnica

que a TLD não alterou a expressão de IL-1 $\beta$  no intestino de animais submetidos à mucosite intestinal, cujo escore foi 4 (3-4) (Figura 29H).

Na Figura 30 pode-se observar o efeito da TLD (60 mg/kg) na marcação de iNOS pelo estudo imunohistoquímico do duodeno de camundongos, onde se constata uma intensa marcação de iNOS ao nível do epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria (escore 4; 3-4) nos animais submetidos à mucosite intestinal (Figuras 30C e 30D). A fotomicrografia 30E mostra redução na marcação de iNOS ao nível do epitélio de revestimento, e especialmente nas células da lâmina própria, no entanto esta diferença não foi significativa ( $p > 0,05$ ) quando se fez a graduação nas amostras estudadas segundo o critério de Yeoh *et al.* (2005), onde observou-se escore de 2,5 (2-4).

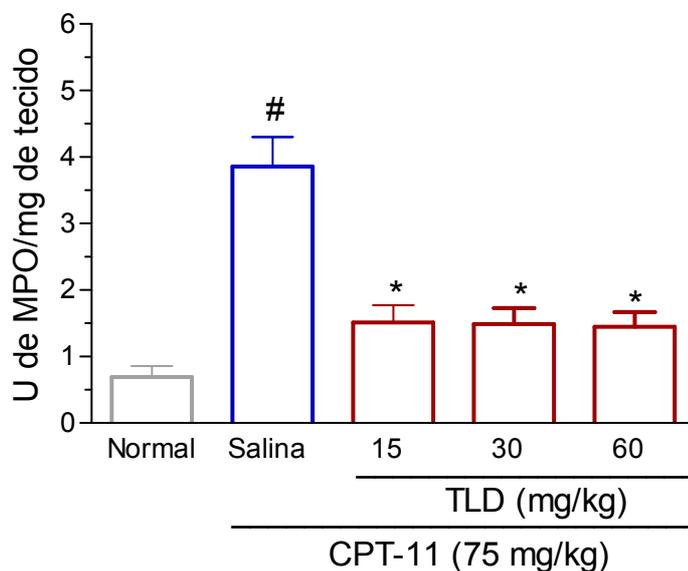


FIGURA 27 – Efeito de diferentes doses da talidomida (TLD) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos Swiss com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (15, 30 e 60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental e uma porção do duodeno foi congelada em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A atividade de MPO foi determinada por ensaio colorimétrico, segundo método modificado pelo descrito por Bradley *et al.* (1982). Os valores representam média  $\pm$  EPM da unidade de MPO/mg de tecido e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

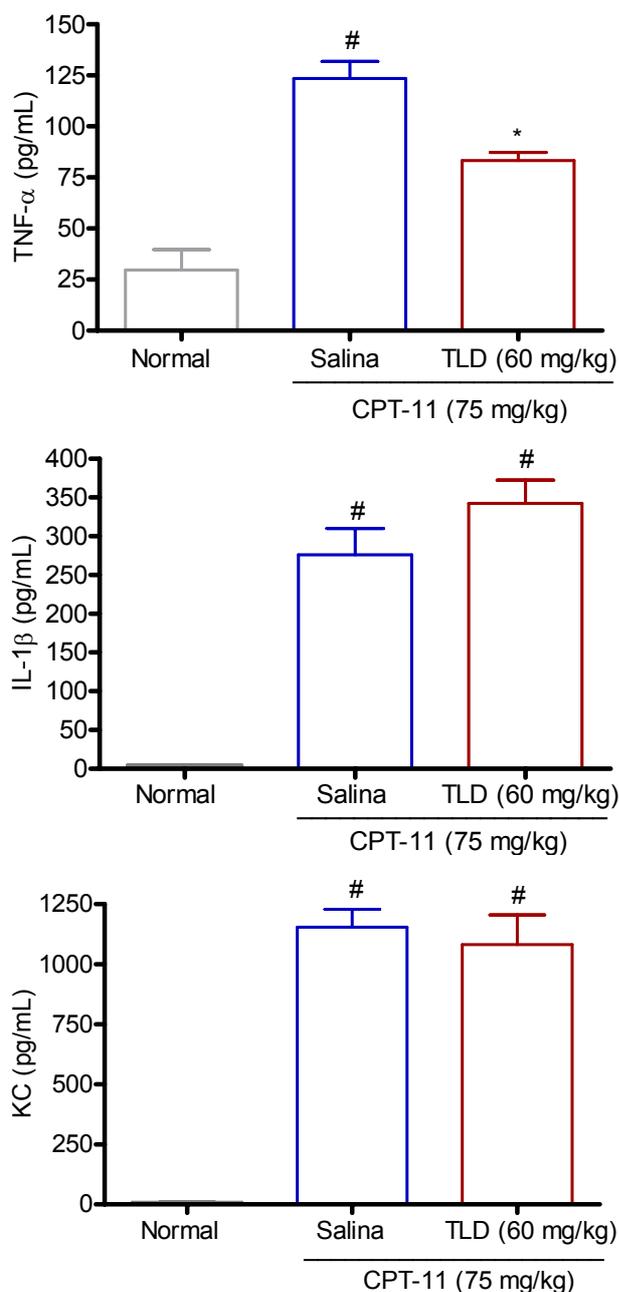


FIGURA 28 – Efeito da talidomida (TLD) nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC) no duodeno de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e uma porção do duodeno foi congelada no freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O ensaio foi realizado por ELISA através do método descrito por Cunha *et al.* (1993). Os valores representam média  $\pm$  EPM da quantidade de citocinas (pg/mL) e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo cinco.

TABELA 9 – Efeito da talidomida (TLD) no grau de expressão de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11)

	CPT-11 (75 mg/kg)			
	Controle negativo	Normal	Salina	TLD (60 mg/kg)
TNF- $\alpha$	0 (0-0)	1 (1-1)	4 (4-4) <sup>#</sup>	2 (1-3) <sup>*</sup>
IL-1 $\beta$	0 (0-0)	1 (1-1)	4 (3-4) <sup>#</sup>	4 (3-4)
iNOS	0 (0-0)	1 (1-2)	4 (3-4) <sup>#</sup>	2,5 (2-4)

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam TLD (60 mg/kg) ou solução salina 0,9% por via subcutânea (s.c.) durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e iNOS. Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$  e anti-iNOS. O grau de expressão foi avaliado por escores descritos por Yeoh *et al.* (2005), onde se tem: 0 – sem marcação; 1 – leve marcação; 2 – moderada marcação; 3 – moderada a intensa marcação e 4 – intensa marcação. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado ao grupo com mucosite intestinal e tratado com salina ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo cinco, à exceção do controle negativo (n=1).

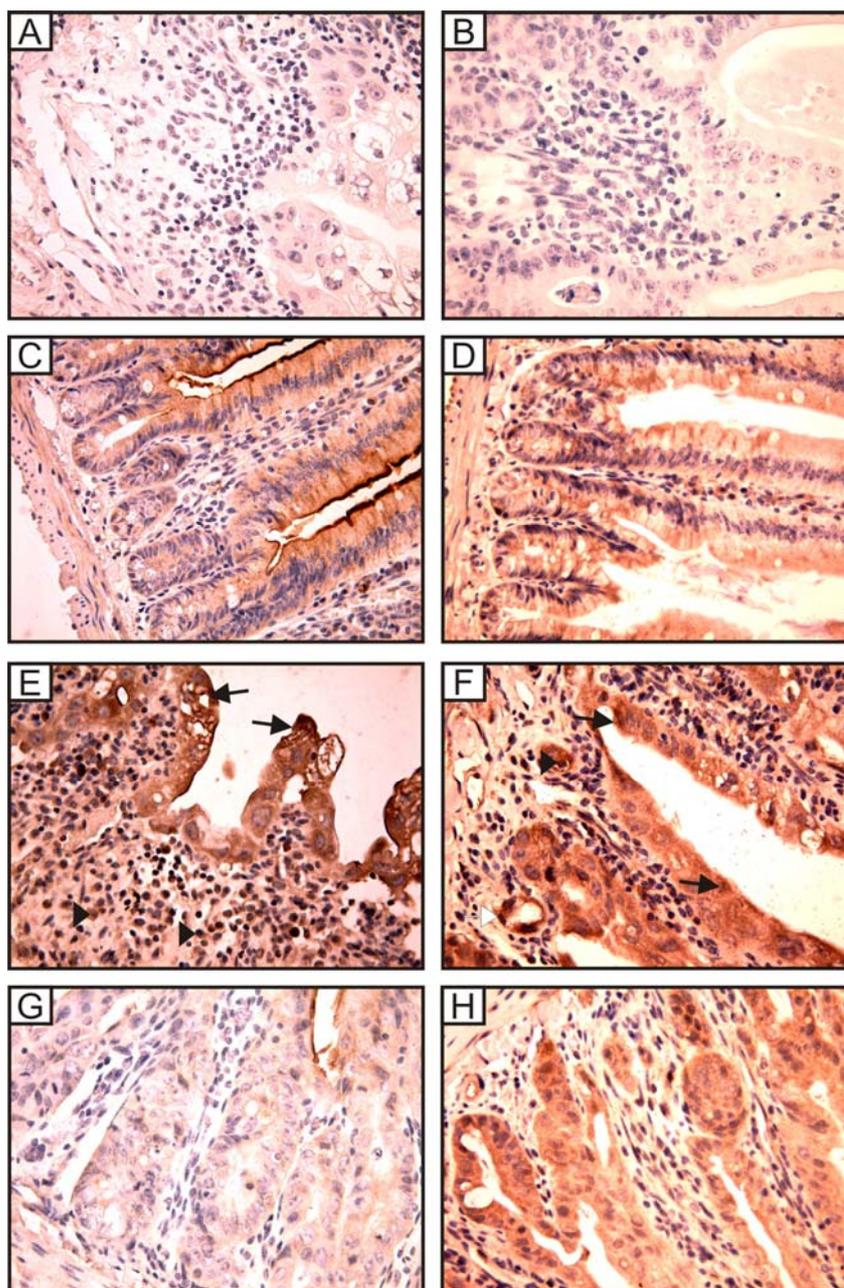


FIGURA 29 – Fotomicrografias da marcação de citocinas ( $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-}\beta$ ) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com talidomida (TLD).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p). TLD (60 mg/kg) ou solução salina 0,9% foi administrado durante 7 dias (s.c.), iniciando um dia antes do CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-}\beta$  (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti- $\text{TNF-}\alpha$  (A) e anti- $\text{IL-}\beta$  (B). Duodeno de um animal normal, mostrando leve marcação de  $\text{TNF-}\alpha$  (C) e  $\text{IL-}\beta$  (D) no epitélio dos vilos. Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando intensa marcação de  $\text{TNF-}\alpha$  (E) e  $\text{IL-}\beta$  (F) no epitélio de revestimento (seta), células da lâmina própria (cabeça de seta) e do endotélio (seta branca). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal tratado com TLD, mostrando a redução na marcação de  $\text{TNF-}\alpha$  (G), mas não de  $\text{IL-}\beta$  (H) no epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria.

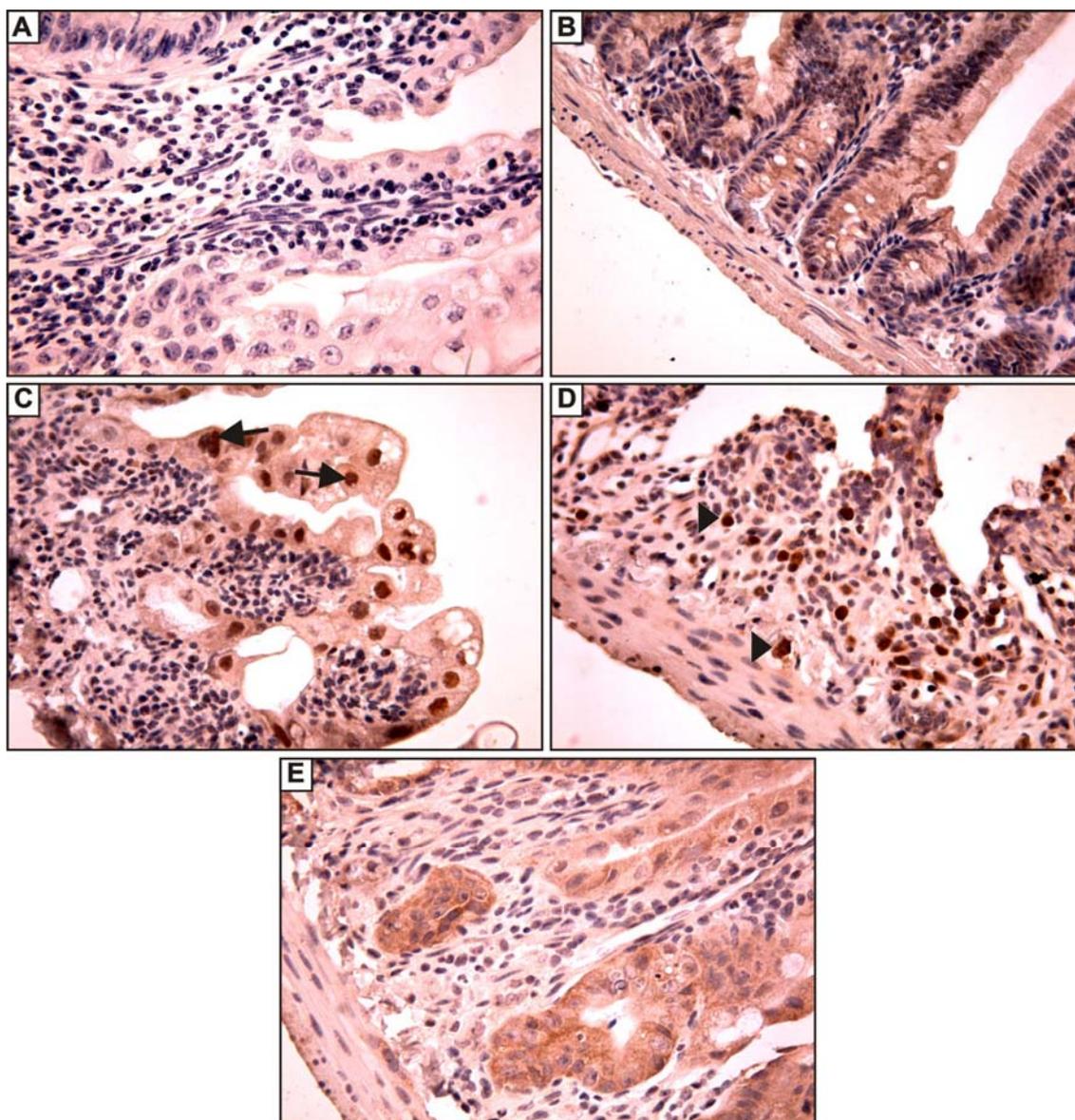


FIGURA 30 – Fotomicrografias da marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com talidomida (TLD).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p). A TLD (60 mg/kg) ou solução salina 0,9% foi administrada durante sete dias (s.c.), iniciando um dia antes do CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de iNOS (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-iNOS(A). Duodeno de um animal normal, mostrando marcação leve a moderada de iNOS no epitélio dos vilos (B). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando intensa marcação de iNOS no epitélio de revestimento (seta C) e nas células da lâmina própria (cabeça de seta D). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal tratado com TLD, mostrando pequena redução na marcação de iNOS ao nível do epitélio de revestimento e, especialmente, nas células da lâmina própria (E).

### 3.4 Efeito do tratamento com CLX na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

#### 3.4.1 Efeito do CLX na severidade da diarreia induzida pelo CPT-11

Os resultados da Tabela 10 demonstram que o CLX, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, não reduziu a severidade da diarreia induzida pelo CPT-11 ( $p > 0,05$ ) em nenhum dos dias estudados. Não houve também alteração na incidência da diarreia precoce, avaliada imediatamente e após uma hora da administração da droga.

#### 3.4.2 Efeito do CLX na variação da massa corpórea de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Os dados observados na Figura 31 demonstram que o CLX (3, 10 e 30 mg/kg) não foi capaz de reduzir a perda de peso dos animais com mucosite intestinal induzida com CPT-11 na dose de 75 mg/kg ( $p > 0,05$ ).

#### 3.4.3 Efeito do CLX no leucograma de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Os resultados apresentados na Figura 32 mostram que o CLX, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, administrado por sete dias consecutivos, não reverteu a leucopenia induzida pelo tratamento com CPT-11 ( $p > 0,05$ ).

#### 3.4.4 Efeito do CLX na sobrevivência de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

A Figura 33 demonstra que o CLX reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) a sobrevivência dos animais submetidos ao tratamento com CPT-11. No sétimo dia experimental, a sobrevivência do grupo tratado com CLX na dose de 3 mg/kg foi de 50%, enquanto nos grupos tratados com CLX 10 e 30 mg/kg foi de 35,29% e 38,89%, respectivamente. O grupo com mucosite intestinal, mas não tratado com CLX, teve sobrevivência de 75%.

TABELA 10 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) na severidade da diarreia induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*.

<b>CPT-11 (75 mg/kg)</b>					
<b>CLX (mg/kg)</b>					
<b>Dia</b>	<b>Normal</b>	<b>Água</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>30</b>
1°	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
2°	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
3°	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
4°	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-3)
5°	0 (0-0)	0 (0-3)	2 (0-3)	0 (0-3)	3 (0-3)
6°	0 (0-0)	3 (0-3)#	1,5 (0-3)	3 (0-3)	3 (0-3)
7°	0 (0-0)	3 (0-3)#	2 (0-3)	3 (2-3)#	3 (0-3)

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (3, 10 e 30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. A diarreia foi avaliada por escores propostos por Kurita *et al.* (2000), onde se tem: 0 – normal, ausência de diarreia; 1 – diarreia leve, fezes levemente umedecidas; 2 – diarreia moderada, fezes sem formas com presença de quantidade moderada de sujidades na região perianal; e 3 – diarreia grave, fezes aquosas com grande quantidade de sujidades na região perianal. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

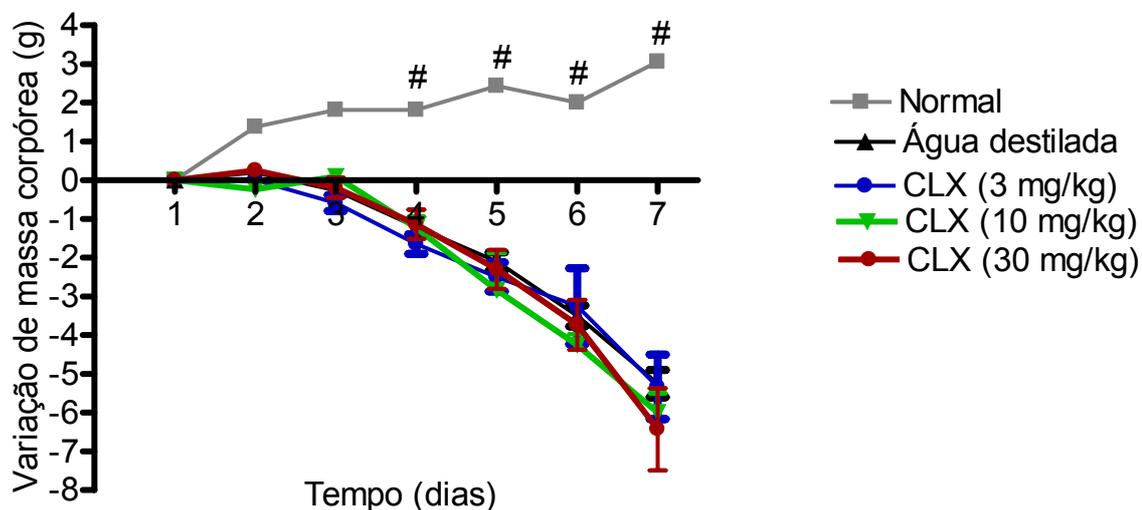


FIGURA 31 – Efeito de diferentes doses de celecoxibe (CLX) na variação da massa corpórea de camundongos Swiss com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (3, 10 ou 30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. As massas corpóreas foram avaliadas diariamente até o sétimo dia experimental. Os pontos representam média  $\pm$  EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas corpóreas obtidas diariamente e a inicial. Os dados foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais com mucosite intestinal tratados com água destilada e com CLX ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo oito.

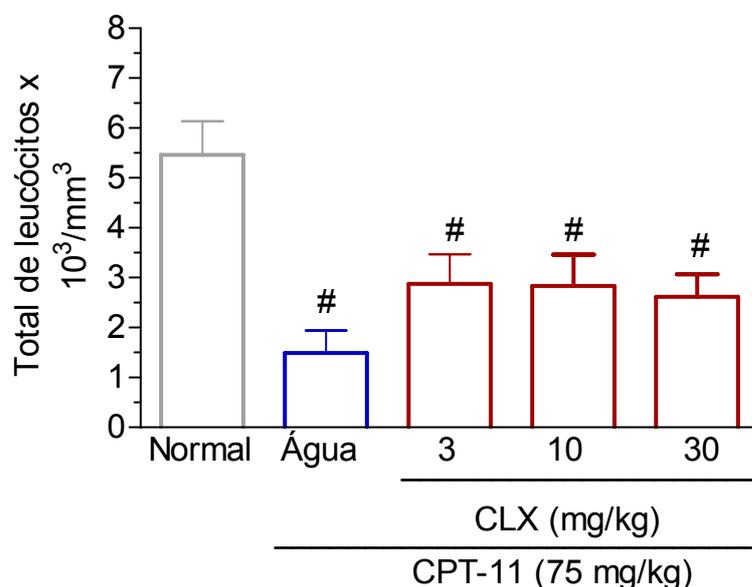


FIGURA 32 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) no leucograma de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida por cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (3, 10 e 30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. O sangue foi colhido por punção na artéria ocular imediatamente antes do sacrifício e a contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, conforme descrito por Moura *et al.* (1998). Os valores representam média  $\pm$  EPM do número total de leucócitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

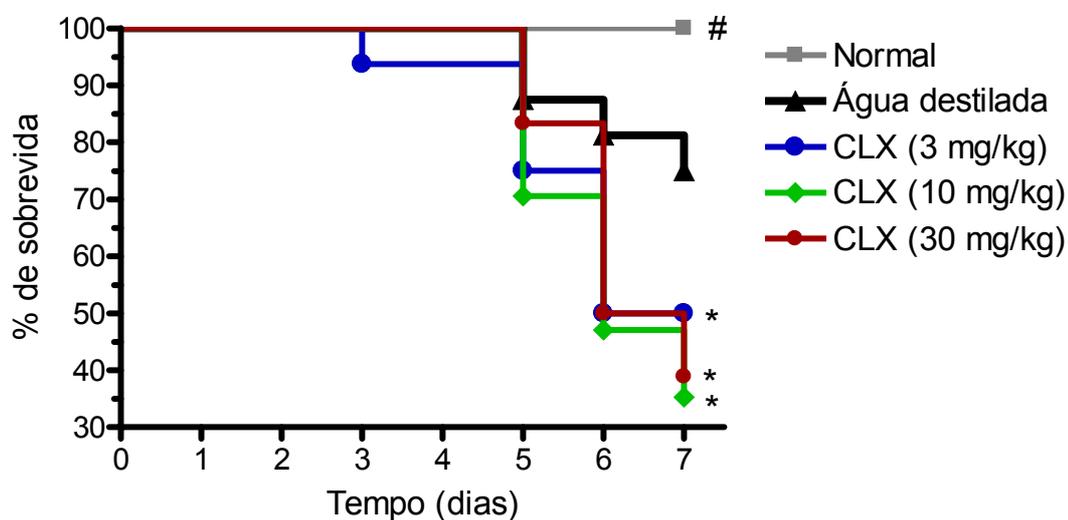


FIGURA 33 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) na curva de sobrevivência de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (3, 10 e 30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. As taxas de sobrevivência foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de logrank. # Diferença estatística comparado aos animais com mucosite intestinal tratados com água destilada e CLX ( $p < 0,05$ ). \* Diferença estatística comparado aos animais com mucosite intestinal tratados com água destilada ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo dez.

### 3.4.5 Efeito do CLX nas estruturas histológicas do intestino de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

O tratamento com CLX nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, durante sete dias consecutivos, não reverteu significativamente as alterações histológicas no duodeno, jejuno e íleo induzidas pelo CPT-11. Quando se classificou a mucosite segundo os escores descritos por Woo *et al.* (2000), verificou-se que o tratamento com CLX não reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) o grau de mucosite intestinal provocada pela administração do CPT-11 (Tabela 11).

A Figura 34 mostra que nenhuma dose utilizada no tratamento com CLX foi capaz de reverter significativamente ( $p > 0,05$ ) as alterações morfométricas observadas no duodeno, jejuno e íleo de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.

TABELA 11 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) no grau de mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos Swiss.

	CPT-11 (75 mg/kg)				
	Normal	Água	CLX (mg/kg)		
			3	10	30
Duodeno	0 (0-0)	4 (4-4)#	3 (0-4)	2 (0-4)	4 (0-4)#
Jejuno	0 (0-0)	4 (3-4)#	4 (0-4)#	3 (2-4)	4 (2-4)#
Íleo	0 (0-0)	4 (3-4)#	3 (0-4)	4 (2-4)#	4 (3-4)#

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (3, 10 e 30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. A avaliação histológica foi realizada por escores propostos por Woo *et al.* (2000), onde se tem: 0 – ausência de lesão; 1 – menos de 10% das criptas contêm células necróticas; 2 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta; 3 – mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (< 20%), os vilos encontram-se encurtados, variável hipertrofia/hiperbasofilia nas criptas remanescentes; 4 – lesões mais extensas que em 3. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

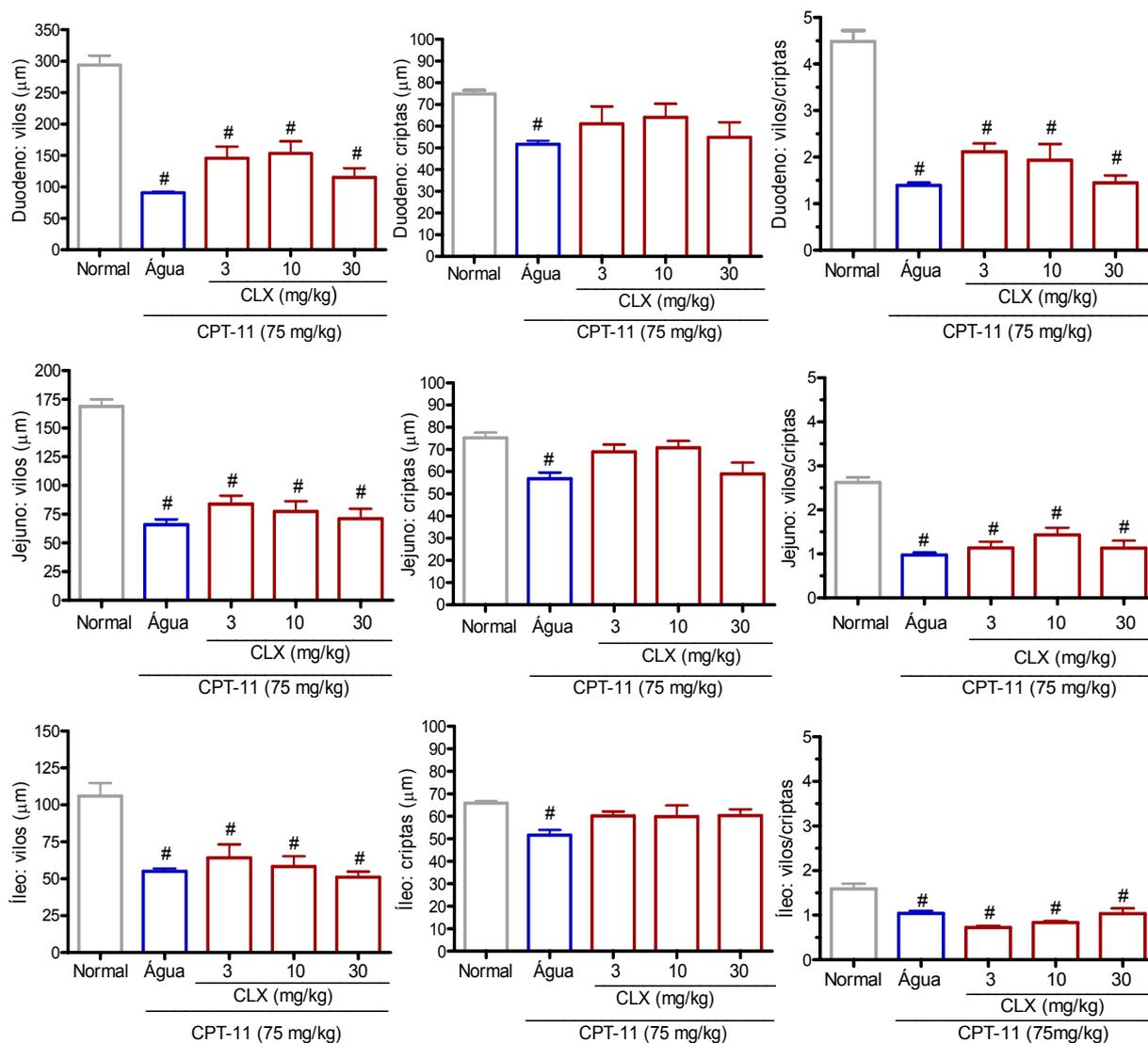


FIGURA 34 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) nas alterações morfométricas intestinais induzidas pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) em camundongos *Swiss*.

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (3, 10 e 30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejueno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. Os valores representam média  $\pm$  EPM e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

#### 3.4.6 Efeito do CLX na atividade de MPO no duodeno de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Os resultados apresentados na Figura 35 mostram que nenhuma dose de CLX foi capaz de reduzir ( $p > 0,05$ ) a atividade da MPO no intestino de animais com mucosite intestinal. Portanto, o tratamento com CLX não reduziu a infiltração neutrofilica induzida pelo CPT-11.

#### 3.4.7 Efeito do CLX na expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11

Na Tabela 12 e na Figura 36 observam-se o resultado do efeito do CLX (30 mg/kg), na marcação de COX-2 por imunohistoquímica na mucosa duodenal de camundongos submetidos à mucosite intestinal pelo CPT-11. A fotomicrografia 36C mostra o duodeno de animais tratados com CPT-11, onde se vê além das marcações de COX-2 ao nível do epitélio de revestimento, marcações nas criptas, mostrando assim, um aumento na expressão de COX-2 ( $p < 0,05$ ) na evolução da mucosite (escore 2,5; 2-3). Entretanto, o tratamento com CLX não foi capaz de reduzir ( $p > 0,05$ ) a expressão desta enzima no intestino (escore 2; 1-3) (Figura 36D).

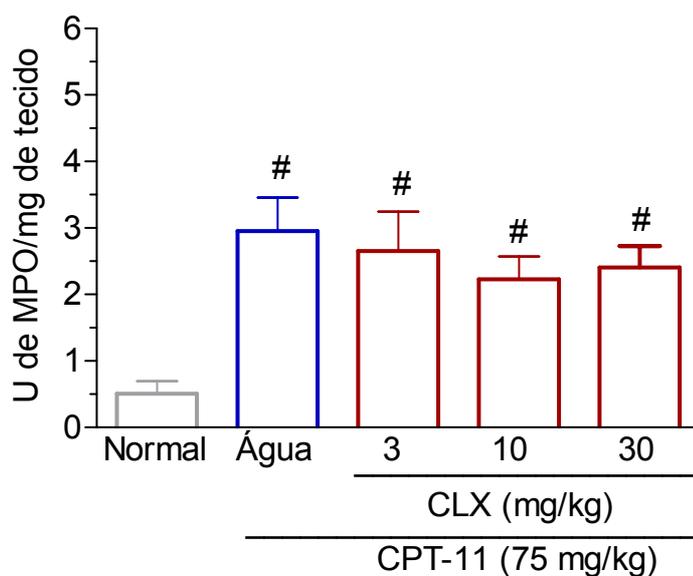


FIGURA 35 – Efeito de diferentes doses do celecoxibe (CLX) na atividade de mieloperoxidase (MPO) no duodeno de camundongos Swiss com mucosite intestinal induzida por cloridrato de irinotecano (CPT-11).

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (3, 10 e 30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e uma porção do duodeno foi congelada em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A atividade de MPO foi determinada por ensaio colorimétrico, segundo método modificado pelo descrito de Bradley *et al.* (1982). Os valores representam média  $\pm$  EPM da unidade de MPO/mg de tecido e foram analisados pelo teste de Bonferroni (ANOVA). # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo seis.

TABELA 12 – Efeito do celecoxibe (CLX) no grau de expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* com mucosite intestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11)

	CPT-11 (75 mg/kg)			
	Controle negativo	Normal	Salina	CLX (30 mg/kg)
COX-2	0 (0-0)	1 (1-1)	2,5 (2-3) <sup>#</sup>	2 (1-3)

A mucosite intestinal foi induzida através da administração do CPT-11 (75 mg/kg de peso, i.p.) por quatro dias consecutivos. Os animais receberam CLX (30 mg/kg) ou água destilada por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do tratamento com CPT-11. Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de COX-2. Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-COX-2. O grau de expressão foi avaliado por escores descritos por Yeoh *et al.* (2005), onde se tem: 0 – sem marcação; 1 – leve marcação; 2 – moderada marcação; 3 – moderada a intensa marcação e 4 – intensa marcação. Os valores representam mediana e variação, e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com comparação de Dunn. # Diferença estatística comparado aos animais normais ( $p < 0,05$ ). O número de animais utilizados em cada grupo foi no mínimo cinco, à exceção do controle negativo (n=1).

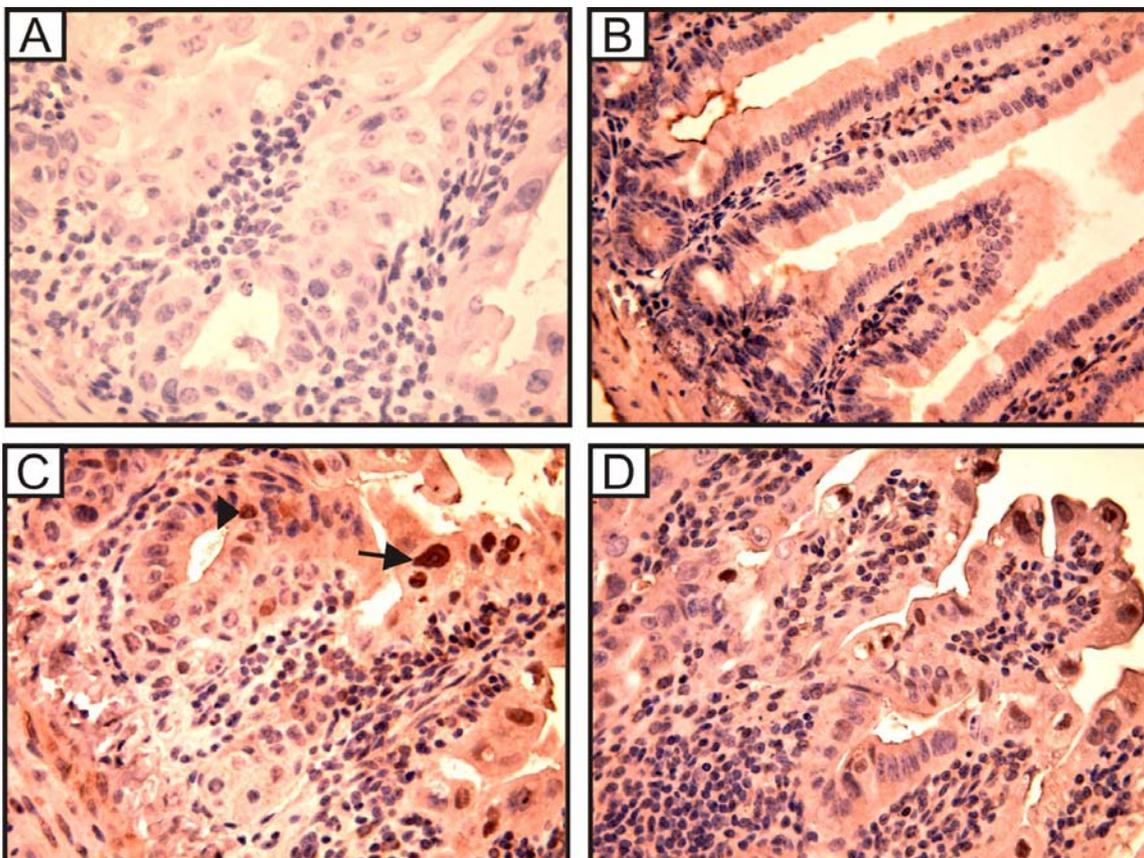


FIGURA 36 – Fotomicrografias da marcação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) na mucosa duodenal de camundongos *Swiss* normais, dos submetidos à mucosite intestinal pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11) sem tratamento e com tratamento com celecoxibe (CLX).

Os animais receberam CPT-11 (75 mg/kg) ou solução salina 0,9% por quatro dias consecutivos (i.p). O CLX (30 mg/kg) ou água destilada foi administrado por gavagem durante sete dias, iniciando um dia antes do CPT-11. Os animais foram sacrificados no sétimo dia experimental, e o duodeno foi removido para técnica de imunohistoquímica para detecção de COX-2 (aumento de 400x). Controle negativo, duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal na ausência de anticorpo primário anti-COX-2 (A). Duodeno de um animal normal, mostrando leve marcação de COX-2, principalmente nas criptas (B). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal, apresentando moderada a intensa marcação de COX-2 no epitélio de revestimento (seta C) e nas criptas (cabeça de seta C). Duodeno de um animal submetido à mucosite intestinal tratado com CLX, mostrando que não houve redução na marcação de COX-2 (D).

## 4 DISCUSSÃO

Estudos clínicos apontam que o CPT-11 associa-se com a incidência de mais de 20% de mucosite intestinal severa (RUBENSTEIN *et al.*, 2004), podendo chegar a acometer até 40% dos pacientes (ALIMONTI *et al.*, 2004). Entretanto, a patogênese da mucosite intestinal induzida por este agente ainda não está totalmente esclarecida e não existe um protocolo definitivo para a sua prevenção e tratamento (GIBSON *et al.*, 2002a e 2002b; ALIMONTI *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006).

Devido à dificuldade encontrada para se determinar os mecanismos envolvidos na mucosite intestinal em seres humanos, têm-se desenvolvido modelos experimentais com o objetivo de investigar os mediadores relacionados e avaliar os efeitos de diferentes agentes farmacológicos, a fim de reduzir a sua incidência e severidade.

A mucosite intestinal foi induzida em camundongos *Swiss* seguindo-se inicialmente o modelo proposto por Ikuno *et al.* (1995), que utilizou durante quatro dias a dose de 100 mg/kg. Escolheu-se o camundongo pela sua semelhança fisiológica e imunológica com humanos (WADE; DALY, 2005) e pelo fato destes animais terem um fácil manejo e necessitarem de uma menor quantidade de droga. Entretanto, observou-se nos animais que receberam a dose de 100 mg/kg uma alta mortalidade (50%), e então foram testadas as doses de 50 e 75 mg/kg durante quatro dias consecutivos.

O presente estudo demonstrou que o tratamento com CPT-11 (75 e 100 mg/kg) causou significativa mucosite intestinal acompanhada de diarreia, corroborando outros trabalhos que relatam que a diarreia é uma manifestação clínica importante observada na mucosite intestinal (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBENSTEIN *et al.*, 2004; AVRITSCHER *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006). Dois tipos de diarreia são associados com o uso do CPT-11: a diarreia precoce e a diarreia tardia (JANSMAN *et al.*, 2001; RUBENSTEIN *et al.*, 2004).

Apesar da incidência da diarreia precoce observada em nosso estudo não ter sido significativa sob o ponto de vista estatístico, não foi desprezível o seu aparecimento nos animais tratados com CPT-11 nas doses maiores. A dose de

75 mg/kg induziu diarreia leve (escore 1) em 35,5% dos animais após a segunda e terceira administração, e 50% após a quarta. Percentagem maior foi vista na dose de 100 mg/kg, onde se observou 43,75% dos animais com diarreia no segundo e terceiro dias e 56,25% após a última administração. Incidência superior foi relatada por Kase *et al.* (1997), em ratos, após a administração (i.v.) de 60 mg/kg de CPT-11 por quatro dias consecutivos, que observou diarreia precoce de grau leve (escore 1) no primeiro e segundo dias de administração da droga, aparecendo em 50% e 83,33% dos animais, respectivamente. No terceiro e quarto dias, diarreia aguda foi observada em todos os ratos de forma severa (escore 2). Esta diferença pode ser justificada pelo fato de nosso trabalho ser com camundongo *Swiss* e não ratos *Wistar* como o do referido autor. Além disso, a via intravenosa constitui uma via mais rápida de administração de drogas obtendo-se a concentração desejada com exatidão, enquanto a via intraperitoneal (i.p.), por nós utilizada, caracteriza-se pela ocorrência de perdas no metabolismo de primeira passagem no fígado, apesar de oferecer uma grande área de superfície absorptiva, onde a droga entra rapidamente na circulação, principalmente pela veia porta (BENET *et al.*, 2003). Saliente-se também que o modelo experimental por nós escolhido, conforme relatado por Ikuno *et al.* (1995), é utilizado para o estudo da diarreia tardia.

A diarreia precoce ocorre geralmente com uso do CPT-11 em altas doses, em consequência do aumento da atividade colinérgica, que estimula a contratilidade intestinal, prejudicando a função absorptiva e secretora da mucosa intestinal (GANDIA *et al.*, 1993; DODDS *et al.*, 1999; DODDS; RIVORY, 1999). Frequentemente, é acompanhada de outros sintomas colinérgicos como salivação, dor abdominal, vômitos, congestão nasal e bradicardia (GANDIA *et al.*, 1993; SALIBA *et al.*, 1998; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001). Kase *et al.* (1997) caracterizaram a diarreia precoce induzida pelo CPT-11 como aquela que ocorre até uma hora após a administração da droga. Esta diarreia geralmente é transitória e dificilmente severa, podendo ser rapidamente suprimida com uso de atropina (KASE *et al.*, 1997; SALIBA *et al.*, 1998; DODDS *et al.*, 1999; DODDS; RIVORY, 1999; TAKIMOTO; ARBUCK, 2001; SALTZ *et al.*, 2003).

Várias teorias tentam justificar a atividade colinérgica do CPT-11. Dodds *et al.* (1999) sugerem que este efeito é mediado por estímulo ganglionar provocado pela liberação da cadeia lateral dipiperidina quando o irinotecano é ativado a SN-38 pelas esterases. Porém, outros estudos verificaram que o CPT-11 possui atividade

anticolinesterásica, sendo um inibidor potente, reversível e seletivo da AChE (DODDS; RIVORY, 1999; DODDS *et al.*, 2001). Segundo Kase *et al.* (1997), os sintomas de diarreia precoce acompanham um aumento de PGE<sub>2</sub> no cólon descendente, sendo que a administração de atropina inibe seu aparecimento e normaliza os níveis de PGE<sub>2</sub>. Já o tratamento com indometacina normaliza PGE<sub>2</sub>, mas falha na prevenção da diarreia precoce. Portanto, a diarreia ocorre devido à ação anticolinesterásica da droga que provoca hiperperistaltismo mediado pelo aumento de PGE<sub>2</sub>.

Nós demonstramos que o sintoma da diarreia tardia causado pelo tratamento durante quatro dias com CPT-11, na dose de 100 mg/kg, teve início no quinto dia experimental, acometendo 75% dos animais (escore 3; 0-3), enquanto a dose de 75 mg/kg apareceu no sexto dia em 50% do grupo (escore 3; 0-3). Portanto, o aparecimento dos sintomas diarreicos é diretamente proporcional à dose administrada, o que foi também relatado por outros autores. Ikuno *et al.* (1995) relataram o aparecimento de diarreia em camundongos após 5,8 dias da primeira administração da droga na dose de 100 mg/kg por quatro dias seguidos. Doses inferiores (30 e 60 mg/kg) durante quatro dias consecutivos foram testadas por Kase *et al.* (1997), em ratos, que verificaram que a dose de 60 mg/kg induziu diarreia tardia a partir do terceiro dia de administração da droga. Entretanto, a administração da dose de 30 mg/kg não foi capaz de induzir diarreia neste modelo experimental.

Clinicamente, a diarreia tardia ocorre em 82% (SALIBA *et al.*, 1998) a 87% dos pacientes (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; JANSMAN *et al.*, 2001), sendo que em 30% destes a diarreia ocorre em forma severa (ENZINGER *et al.*, 2005). Quando ela aparece em período concomitante com a mielossupressão pode provocar o desenvolvimento de uma complicação infecciosa (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; JANSMAN *et al.*, 2001). Além disso, quando grave pode limitar a eficácia terapêutica do tratamento com CPT-11, já que algumas vezes é necessário reduzir sua dose ou até mesmo suspender seu uso (BOKEMEYER; HARTMANN, 1999; IKEGAMI *et al.*, 2002; ABIGERGES *et al.* 1994; ALIMONTI *et al.*, 2004), como já referido.

Existem relatos que a diarreia tardia induzida pelo CPT-11 é secretória, decorrente da redução intestinal de absorção de fluidos e com a presença de componentes exsudativos (SAKAI *et al.*, 1995, 1997; SALIBA *et al.*, 1998). A diarreia, portanto, pode ser causada pelo transporte anormal de água e íons por falha nos

mecanismos secretórios, provavelmente provocada pelas alterações das células epiteliais induzidas pelo agente quimioterápico (IKUNO *et al.*, 1995; SALIBA *et al.*, 1998).

Nossos achados mostraram que o tratamento com CPT-11 (75 e 100 mg/kg) induziu uma destruição significativa da mucosa do duodeno, jejuno e íleo, caracterizando mucosite grau 4, segundo o critério de classificação descrito por Woo *et al.* (2000). Observou-se achatamento acentuado dos vilos, acompanhado de uma redução significativa do tamanho e número das criptas, vacuolização de enterócitos e infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria.

Esses dados estão de acordo com prévios estudos que demonstram aspectos similares da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 (IKUNO *et al.*, 1995; CAO *et al.*, 1998; KURITA *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2006a). Em camundongos, a administração de 100 mg/kg (durante quatro dias – i.p.) alterou a mucosa intestinal no sétimo dia experimental por induzir apoptose e diferenciação de células caliciformes. Observou-se no íleo, vacuolização epitelial, dilatação dos vasos sangüíneos com infiltrado de células PMN, e redução do tamanho dos vilos. No ceco, encontrou-se hiperplasia de células caliciformes, com aumento da produção de muco. Estas alterações estruturais e funcionais são responsáveis pela má-absorção de água e eletrólitos e hipersecreção de mucina que ocasionam a diarreia (IKUNO *et al.*, 1995). Já em outro modelo experimental, a administração do CPT-11 na dose de 200 mg/kg, por três dias consecutivos (i.v.), provocou, 24 horas após o final do tratamento, encurtamento dos vilos, que quando presentes mostraram-se de forma irregular e atrofiada, redução da profundidade das criptas, e ainda redução de células caliciformes (CAO *et al.*, 1998). Os achados de Gibson *et al.* (2003) mostraram que as alterações histológicas induzidas em ratos pelo CPT-11 em dose única (100, 150 e 200 mg/kg, i.p.) foram marcantes no cólon, que apresentou debridaç o celular e hipersecreção de muco na superfície luminal, entretanto, com pouco infiltrado inflamatório.

A mucosite intestinal é atribuída à alta taxa de proliferação e *turnover* das células do intestino que é afetada pela quimioterapia do câncer. Estas drogas provocam destruição das células de divisão presentes nas criptas, responsáveis pela renovação epitelial dos vilos (KEEFE *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2002a e 2002b; XIAN, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; BOWEN *et al.*, 2006; GIBSON; KEEFE, 2006). É consenso que os agentes quimioterápicos causam

apoptose, que provoca hipoproliferação das criptas (KEEFE *et al.*, 2000; GIBSON *et al.*, 2002a e 2002b; GIBSON; KEEFE, 2006).

Os eventos histopatológicos que acompanham a mucosite intestinal em modelo animal são idênticos aos observados em humanos. No intestino delgado sabe-se que a apoptose nas criptas ocorre desde o primeiro dia após administração da droga, precedendo a atrofia dos vilos e criptas. Estas alterações são acompanhadas pelo aparecimento dos sintomas gastrintestinais, prejuízo da absorção de monossacarídeos e aumento da permeabilidade intestinal que ocorre entre o terceiro e sétimo dia após quimioterapia (KEEFE *et al.*, 2000).

A magnitude da destruição induzida pelo CPT-11 foi também avaliada por morfometria, onde se observou redução da altura dos vilos nas três porções intestinais em todas as doses estudadas (50, 75, 100 mg/kg), bem como menor profundidade das criptas em todo intestino com as doses de 75 e 100 mg/kg. A dose de 50 mg/kg reduziu significativamente a profundidade das criptas apenas no íleo.

Comparando nosso estudo com o desenvolvido por Gibson *et al.* (2003), encontram-se diferenças. Estes pesquisadores verificaram no jejuno aumento de apoptose acompanhado de aumento do aprofundamento das criptas quando ratos receberam CPT-11 na dose única de 100 ou 150 ou 200 mg/kg (i.p.). Este aumento da profundidade das criptas pode indicar a tentativa de recuperação do epitélio (LIMA, 2004). Esta diferença de resultados deve-se ao fato dos experimentos ocorrerem em tempos diferentes. Gibson *et al.* (2003) observaram hipoplasia de criptas 24 horas após a administração de dose única de CPT-11 e hiperplasia após 72 horas. No nosso modelo, o CPT-11 foi administrado por quatro dias consecutivos, assim a tentativa de recuperação das criptas três dias após o término da administração da droga ainda não havia iniciado, provavelmente pelo fato de o tratamento ter sido mais prolongado.

Keefe *et al.* (2000), em estudo clínico utilizando regimes de múltiplas drogas quimioterápicas, observaram redução na área dos vilos e no tamanho das criptas em 24 e 26%, respectivamente, no terceiro dia após a quimioterapia, sendo que no 16º dia estas medidas retornaram aos valores iniciais. A contagem mitótica também reduziu em 72% no terceiro dia após quimioterapia e retornou aos valores anteriores ao tratamento no 16º.

Outras pesquisas observaram que os produtos do metabolismo do CPT-11 estão implicados na gênese da diarreia (GUPTA *et al.*, 1997; TAKASUNA *et al.*,

1998; XIE *et al.*, 2002; CHOWBAY *et al.*, 2003; TAKASUNA *et al.*, 2006). Nesta direção, Xie *et al.* (2002), em estudo farmacocinético com o irinotecano, verificaram correlação entre a diarreia e a curva de concentração plasmática do SN-38G, metabólito inativo. A diarreia pode ser consequência de uma maior concentração de SN-38 no intestino formada a partir de SN-38G. As bactérias intestinais formadoras de glicuronidases seriam responsáveis pela transformação de SN-38G em SN-38 no lúmen intestinal, e então este composto ativo apresenta efeito tóxico, sendo responsável pela destruição das células intestinais (GUPTA *et al.*, 1997; TAKASUNA *et al.*, 1998; XIE *et al.*, 2002; CHOWBAY *et al.*, 2003; TAKASUNA *et al.*, 2006).

Um outro aspecto por nós observado foi a variação da massa corpórea nos animais com mucosite intestinal. O CPT-11 nas três doses estudadas (50, 75 e 100 mg/kg) provocou perda de peso a partir do quarto dia experimental. A perda de peso foi dose-dependente, sendo maior no grupo tratado com maior dose de CPT-11. Resultados semelhantes foram descritos por Kase *et al.* (1997), em ratos, onde se observou perda de peso significativa a partir do terceiro dia de tratamento com CPT-11 na dose de 60 mg/kg administrado durante quatro dias, e a partir do quarto dia utilizando 30 mg/kg, seguindo o mesmo protocolo. Redução significativa de peso foi também observada em ratos *Sprague-Dawley* no sexto dia da primeira injeção do CPT-11 (60 mg/kg, i.v.), que foi administrado durante quatro dias consecutivos (YANG *et al.*, 2006a). A redução de peso observada em nosso estudo e de outros autores pode ser explicada pela redução do consumo alimentar, pela diminuição da absorção de alimentos devido às alterações das vilosidades intestinais e pela perda de água e eletrólitos provocada em consequência da diarreia, (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; AVRITSCHER *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006).

No decorrer da presente investigação, observou-se, ainda, que o CPT-11 nas doses utilizadas (50, 75 e 100 mg/kg) foi capaz de provocar leucocitose significativa, corroborando estudos clínicos, que demonstram alta incidência (30 a 36%) de leucopenia, particularmente neutropenia grau 3 e 4 (VAMVAKAS *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2004; ENZINGER *et al.*, 2005). Experimentalmente, o número de neutrófilos e linfócitos no sangue foram reduzidos significativamente em ratos tratados com CPT-11 (YANG *et al.*, 2006a). Sabe-se que a mielossupressão juntamente com a toxicidade gastrintestinal é um dos efeitos colaterais que mais preocupam no tratamento com CPT-11 pelo risco de septicemia (CAO *et al.*, 1998;

ALIMONTI *et al.*, 2004). Além disso, leucopenia grave pode aumentar a incidência de diarreia tardia por favorecer a infecção bacteriana no trato gastrointestinal (KURITA *et al.*, 2000).

Em nosso modelo experimental, CPT-11 também induziu aumento significativo de mortalidade de forma dose-dependente. No sétimo dia experimental, as doses de 50, 75 e 100 mg/kg induziram mortes em 12,5%, 25% e 50% dos animais. Mortalidade significativa com uso do CPT-11 também foi observada por Gibson *et al.* (2003), que relataram mortalidade proporcional à dose administrada. Neste trabalho, em até 96 horas, a administração de dose única de 100 mg/kg em ratos não induziu nenhuma morte. Entretanto, em até 96 horas, quando se injetou uma dose de 150 mg/kg, 50% dos animais morreram; e no grupo em que foi utilizado a dose de 200 mg/kg, a mortalidade foi de 100%. Na autópsia, observou-se peritonite e perfuração duodenal como causa *mortis*. Alta mortalidade com o tratamento com CPT-11 também foi observada por Cao *et al.* (1998), os quais referiram que 86% dos ratos tratados com 200 mg/kg, durante três dias consecutivos, morreram até o 12º dia, sendo que apenas 7% destes animais recuperaram-se da diarreia e sobreviveram.

Com a finalidade de verificar se houve infiltração de células inflamatórias na lesão intestinal induzida pelo CPT-11, determinou-se no intestino a atividade de MPO, uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e que é utilizada como marcador indireto da infiltração neutrofílica local (BRADLEY *et al.*, 1982). Observou-se que o CPT-11 foi capaz de aumentar a atividade de MPO, demonstrando a combinação da injúria epitelial com a infiltração de neutrófilos na mucosa, o que confirma a hipótese da fase inflamatória no processo patológico da mucosite documentado por Sonis em vários estudos (SONIS, 2004, SONIS *et al.*, 2004a) e descrito por Duncan e Grant (2003). Assim, a mucosite induzida por agentes quimioterápicos provoca destruição de células epiteliais e subsequente indução de resposta inflamatória local (SONIS *et al.*, 2004a; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004). Os neutrófilos representam um componente central da resposta imune, que é importante nos mecanismos como fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de mediadores inflamatórios (REAVES *et al.*, 2005).

Várias evidências indicam que a resposta inflamatória à radiação e/ou à quimioterapia tem um papel importante na patogênese da mucosite (KEEFE, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006; LALLA *et al.*, 2006; BÜLTZINGSLÖWEN *et al.*, 2006).

Muitos estudos mostram que mediadores inflamatórios participam no desenvolvimento da lesão e no processo de cicatrização intestinal (SARTOR, 1994; WILLIAMS, 2001; TRIFAN *et al.*, 2002; DE KONING *et al.*, 2006). Diante de tal fato, decidiu-se avaliar o envolvimento de algumas citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC na fisiopatologia dos eventos inflamatórios da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.

Considerando as fases da mucosite intestinal descritas por Duncan e Grant (2003), as alterações observadas por nós no sétimo dia experimental caracterizam a fase inflamatória da mucosite intestinal, portanto este constitui um período importante para o estudo dos mediadores inflamatórios envolvidos na lesão intestinal provocada pelo tratamento com o CPT-11. Resolveu-se avaliar também os níveis intestinais de citocinas no quinto dia experimental, por este ser anterior ao aparecimento do principal sintoma da mucosite, a diarreia.

O tratamento com CPT-11 aumentou significativamente os níveis intestinais de TNF- $\alpha$  no quinto e sétimo dia. Entretanto, citocinas como IL-1 $\beta$  e KC (homóloga à IL-8 dos humanos) apresentaram aumento significativo nos animais sacrificados no sétimo dia, que corresponde ao período em que as lesões intestinais estão severas. Observou-se através da imunohistoquímica que a expressão aumentada de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foi principalmente no epitélio de revestimento e nas células da lâmina própria.

Provavelmente, na mucosite intestinal citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  provocam sinais moleculares que amplificam a lesão. A ativação de TNF- $\alpha$  parece ocorrer antecipadamente. Esta cascata de citocinas na lesão induzida pelo CPT-11 é vista em outros estudos. Experimentalmente, é claramente demonstrado que o TNF- $\alpha$  aparece precocemente na resposta inflamatória (GOWEN *et al.*, 1988; FONG; LOWRY, 1990). Sabe-se também que IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estimulam secreção de outras citocinas, dos metabólitos do ácido araquidônico e das proteases por macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso, fibroblastos e células epiteliais (SARTOR, 1994).

Já foi previamente descrito que a IL-8 é produzida em resposta a mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  e esta parece ter uma participação vital na indução da lesão tecidual induzida pela inflamação (LARSEN *et al.*, 1989). Confirmando estes achados, demonstrou-se que IL-8 circula em níveis máximos após a atividade de TNF- $\alpha$  (MARTICH *et al.*, 1991). Estas três citocinas (IL-1, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) induzem dor inflamatória pela síntese de PGs (THOMAZZI *et al.*, 1997). Na

cascata da inflamação, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  estimulam a transcrição do gene de COX-2 (AKARASEREENONT *et al.*, 1995; DIAZ *et al.*, 1998).

Na mucosite intestinal, alguns autores avaliaram o envolvimento de citocinas na patogênese do processo. Williams (2001) destaca que as citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  e IL-2 contribuem substancialmente para a severidade e a manutenção da mucosite intestinal induzida por quimioterápicos. Gibson *et al.* (2002b) observaram que a IL-11 atenua as alterações morfométricas em modelo de mucosite induzida por MTX. De Koning *et al.* (2006) observaram que macrófagos de camundongos tratados com MTX produziram IL-10 e TNF- $\alpha$  após estímulo com LPS. Assim, a produção de TNF- $\alpha$  parece contribuir para a destruição da mucosa, enquanto IL-10 apresenta efeito protetor, pois nos animais com deficiência de IL-10 observou-se maior perda de peso e maior destruição intestinal. Recentemente, demonstrou-se que a mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 é acompanhada pelo aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 (HU *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2006a).

Na mucosite, as citocinas parecem não só ter um papel na destruição da mucosa, mas também amplificam a lesão. O TNF- $\alpha$  ativa NF- $\kappa$ B e inicia a cascata da MAPK (SONIS, 2004), que sinaliza a destruição intestinal induzida pelo CPT-11 por aumentar a expressão das caspases (BOWEN *et al.*, 2007).

Apesar de nenhum estudo ter avaliado o papel da KC na mucosite intestinal, nossos resultados demonstram que ela parece ser importante no desenvolvimento da lesão. Esta quimiocina é considerada como agente indutor do processo inflamatório intestinal, reconhecido como potente fator quimiotático de neutrófilos (WILSON; GIBSON, 1997; REAVES *et al.*, 2005).

Portanto, a mucosite intestinal induzida pelo CPT-11 em camundongos parece ser um processo complexo, que tem a participação de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC (IL-8). NF- $\kappa$ B pode ser o condutor importante, pois modifica a expressão de citocinas e enzimas. Sua ativação resulta em *upregulation* de uma variedade de genes e subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8) e de COX-2 (KEIFER *et al.*, 2001; SONIS *et al.*, 2004a; SONIS, 2004; YEOH *et al.*, 2005; LOGAN *et al.*, 2007). Sabe-se que a inibição de NF- $\kappa$ B melhora a inflamação (KEIFER *et al.*, 2001).

O aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  também se associa com o desenvolvimento de mucosite oral (RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; SONIS, 2004; SONIS

*et al.*, 2004a). Portanto, estes resultados corroboram a hipótese atualmente defendida por alguns autores, que afirmam que a patobiologia da mucosite oral parece ser também aplicada à mucosite intestinal (RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; KEEFE, 2004; KEEFE, 2006; LALLA *et al.*, 2006; BOWEN *et al.*, 2006; PETERSON *et al.*, 2006). Sabe-se atualmente que a mucosite oral resulta de uma série de fatores dinâmicos e da interação de eventos celulares e moleculares que envolvem todos os elementos da mucosa (SONIS, 2004; SONIS *et al.*, 2004a).

Um outro aspecto importante avaliado em nosso estudo foi a expressão de iNOS por imunohistoquímica. Os resultados mostraram um aumento significativo na marcação de iNOS no intestino de camundongos Swiss tratados com CPT-11, o que sugere que o NO pode ser um mediador importante na evolução na mucosite intestinal induzida por esta droga.

O papel de NO na patogênese de condições inflamatórias é bem documentado pela literatura. Experimentalmente, demonstrou-se a participação de NO na destruição urotelial e nos eventos inflamatórios que acompanham a cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2002). Recentemente, em pesquisa desenvolvida no LAFICA, Leitão *et al.* (2007) demonstraram que o aumento na expressão de iNOS nas bochechas de hamsters submetidos à mucosite oral por 5-FU associou-se com a destruição tecidual e com os eventos inflamatórios. Observaram ainda, que o bloqueio da produção de NO teve um efeito protetor nas lesões que acompanham a mucosite oral, tais como edema, infiltrado de células inflamatórias, hemorragia, formação de úlceras e abscessos e redução de infiltração de neutrófilos.

Em nosso estudo, o aumento na expressão de iNOS ocorreu juntamente com o aumento de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC. Estes achados confirmam estudos anteriores que mostram que citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulam a produção de iNOS em modelo de pancreatite e de cistite hemorrágica (GOMEZ-CAMBRONERO *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2002).

O NO é mediador da citotoxicidade e eventos inflamatórios (MONCADA *et al.*, 1997). Sabe-se que no intestino, a enzima iNOS contribui para inflamação intestinal, induzindo apoptose e estimulando a secreção intestinal (KUBES; McCAFFERTY, 2000; DIJKSTRA *et al.*, 2004). Entretanto, *in vitro*, Sakai *et al.* (2002) verificaram que o aumento da secreção de cloreto induzido pelo CPT-11 no cólon isolado de ratos não é mediado pela produção de NO.

Observou-se ainda uma marcação moderada de iNOS no epitélio intestinal de animais não submetidos à mucosite intestinal, o que nos leva a acreditar que a enzima iNOS pode ser constitutivamente expressa no epitélio intestinal normal em resposta à flora bacteriana local, mas estudos posteriores são necessários para confirmar esta hipótese. Leitão *et al.* (2007) também relataram iNOS no epitélio das bochechas de hamsters não submetidos à mucosite oral.

Diante da confirmação da participação de citocinas e NO na lesão intestinal induzida pelo CPT-11, buscou-se no presente trabalho avaliar drogas que possuem o potencial imunomodulador, com o objetivo de se estabelecer o papel destes mediadores no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11, bem como buscar possibilidades terapêuticas para o seu controle.

Na presente investigação, nós demonstramos que a PTX reduziu significativamente as lesões intestinais, melhorando a recuperação das criptas e vilos. As menores doses de PTX (1,7 e 5 mg/kg) apresentaram um melhor efeito protetor das estruturas intestinais e reduziram significativamente a gravidade da diarreia induzida pelo CPT-11. Entretanto, a maior dose utilizada (15 mg/kg) não teve efeito redutor da diarreia e nem do grau de mucosite intestinal graduada através do escore histológico, apesar desta dose ter também melhorado a recuperação das criptas.

Os efeitos microscópicos foram associados com a redução da infiltração de neutrófilos detectados através da atividade de MPO. Esta atividade da PTX é consistente com prévios estudos que mostram que a droga inibiu a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal induzida pela toxina do *Clostridium difficile* (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2001) e na cavidade sinovial induzida por ovalbumina (BOMBINI *et al.*, 2004).

Entretanto, a PTX não foi capaz de reverter a leucopenia e nem a alteração de peso nos animais submetidos à mucosite experimental, fato já observado por Lima (2004). Também, não apresentou habilidade de melhorar a sobrevivência dos animais, o que de certa maneira era esperado, visto que ocorreu melhora nas lesões intestinais.

Um grande número de investigações tem descrito as propriedades antiinflamatórias da PTX, embora, o seu efeito na diarreia induzida pelo CPT-11 não tenha sido estudado. O tratamento com dose única com PTX (12 mg/kg) atenuou o edema e a inflamação na pancreatite experimental (GÓMEZ-CAMBRONERO *et al.*,

2000). Estudos experimentais realizados em nosso laboratório demonstraram que a PTX (15, 45 e 135 mg/kg) inibiu em ratos o edema de pata induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2001), protegeu ratos da mucosite intestinal induzida por MTX (LIMA, 2004) e hamsters da mucosite oral induzida por 5-FU, diminuindo a intensidade da hiperemia, edema, eritema e infiltrado de células inflamatórias (LIMA *et al.*, 2005). Clinicamente, demonstrou-se que a administração de PTX, em pacientes submetidos a transplante de medula, reduziu a severidade da mucosite e a necessidade de nutrição parenteral total (NPT) (BIANCO *et al.*, 1991). Entretanto, Ferrà *et al.* (1997) não observaram efeito benéfico com a administração de PTX nestes pacientes.

A PTX no modelo por nós utilizado teve melhor efeito antiinflamatório nas menores doses, o que já foi descrito em outros trabalhos. Abdel-Salam *et al.* (2003) verificaram que a administração única de PTX (36 e 72 mg/kg) em ratos 30 minutos antes da injeção de carragenina reduziu edema de pata. Entretanto, a PTX quando usada em doses maiores (144, 200 e 300 mg/kg) inicialmente suprimiu a resposta inflamatória por um período de duas horas, havendo após este período retorno da inflamação. Esta redução da atividade antiinflamatória pode ser decorrente do seu efeito vasodilatador que leva ao aumento do volume intraluminal, da pressão intravascular e da permeabilidade microvascular. E, ainda altas doses desta droga ativa PGI<sub>2</sub> e NO, contribuindo na continuidade da resposta inflamatória (POHANKA; SINZINGER, 1986). Além disso, a PTX apresenta efeito regulador de IL-10, uma citocina antiinflamatória, que parece ser dependente da concentração da droga. *In vitro* e *in vivo*, concentrações maiores de PTX provocam inibição de IL-10, enquanto a menor concentração induz uma maior síntese desta citocina (D'HELLENCOURT *et al.*, 1996; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000; JI *et al.*, 2004). A IL-10 tem sido descrita como uma citocina reguladora na mucosite intestinal induzida por MTX, restringindo a excessiva exacerbação do processo patológico (DE KONING *et al.*, 2006). Provavelmente, o efeito terapêutico observado na presente pesquisa em doses menores que os relatados por outros autores seja pelo fato do nosso modelo utilizar camundongos, enquanto nos outros trabalhos a PTX foi administrada em ratos e hamsters.

O efeito protetor da PTX encontrada no presente estudo pode ser explicado pela sua capacidade de inibir a produção de citocinas inflamatórias. É demonstrado na literatura que a PTX reduz citocinas como TNF- $\alpha$  (SULLIVAN *et al.*,

1988; STRIETER *et al.*, 1988; NEUNER *et al.*, 1994; FUNK *et al.*, 1995; HUIZINGA *et al.*, 1996; SCHMIDT-CHOUDHURY *et al.*, 1996; VAN FURTH *et al.*, 1997; REIMUND *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000; MARCINKIEWICZ *et al.*, 2000; HADDAD *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2004), IL-1 $\beta$  (NEUNER *et al.*, 1994; VAN FURTH *et al.*, 1997; REIMUND *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2000) e IL-8 (MARTICH *et al.*, 1991; NEUNER *et al.*, 1994; GUTIERREZ-REYES *et al.*, 2006). No presente estudo, demonstramos que o tratamento com PTX (1,7 mg/kg) reduziu os níveis intestinais de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC.

Foi também observado que o tratamento com PTX reduziu significativamente a marcação de iNOS principalmente nas células da lâmina própria. Estes achados estão de acordo com os descritos por Gómez-Cabronero *et al.* (2000), que observaram na pancreatite experimental aumento na produção de NO que foi prevenida com o tratamento com PTX. Beshay *et al.* (2001) também observaram supressão dos níveis de expressão da iNOS *in vitro* e *in vivo* com o uso da PTX. A menor produção de NO nos animais tratados com PTX pode ser em consequência da redução da infiltração de neutrófilos, devido à redução de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , conforme encontrado por nós e por outros autores (GOMEZ-CAMBRONERO *et al.*, 2000).

O TNF- $\alpha$  foi a primeira citocina observada em níveis elevados na lesão intestinal induzida pelo CPT-11. Além disso, através da imunohistoquímica é evidente a sua forte marcação no epitélio de revestimento intestinal e nas células da lâmina própria, mostrando sua importante participação na patogênese do processo. Assim, resolveu-se testar o efeito da TLD na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11, a fim de se verificar o papel de TNF- $\alpha$  nesta lesão intestinal e verificar o potencial terapêutico desta droga. A ação parcial e específica da TLD para TNF- $\alpha$  sugere que esta droga pode ser utilizada no tratamento de condições inflamatórias em que TNF- $\alpha$  induz efeitos tóxicos, sem que a resposta imune seja totalmente suprimida (MOREIRA *et al.*, 1993; KLAUSNER *et al.*, 1996).

Os resultados mostraram que a TLD não reverteu significativamente a intensidade da diarreia induzida pelo CPT-11. Entretanto, a maior dose utilizada (60 mg/kg) alterou de forma significativa alguns aspectos histológicos da mucosa duodenal, avaliada pelos escores propostos por Woo *et al.* (2000) e pela morfometria. O maior aprofundamento das criptas no segmento duodenal demonstra uma recuperação na mucosa intestinal, assim provavelmente, a TLD estimulou a proliferação de células das criptas. Talvez a redução da resposta inflamatória tenha

antecipado a fase de cicatrização da mucosite intestinal. Os demais segmentos intestinais não foram protegidos pelo tratamento com TLD, o que talvez explique a ineficácia da droga em prevenir a diarreia.

Um possível mecanismo que explicaria tais resultados seria a supressão do TNF- $\alpha$ , considerado agente importante na mucosite (SONIS, 2004; SONIS *et al.*, 2004a), o que foi confirmado em nosso trabalho, visto que se observou que a TLD reduziu significativamente os níveis intestinais de TNF- $\alpha$  determinado por ELISA e a sua marcação nas células da lâmina própria e no epitélio de revestimento avaliado por imunohistoquímica. É bem documentado pela literatura que a TLD reduz TNF- $\alpha$  (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; MOREIRA *et al.*, 1997; TAVARES *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004). *In vitro*, a TLD inibiu a síntese de TNF- $\alpha$  em cultura de monócitos humanos estimulados com LPS e produtos de *M. leprae* (SAMPAIO *et al.*, 1991, MOREIRA *et al.*, 1993) e em cultura de macrófagos obtida do lavado broncoalveolar de pacientes com tuberculose (TAVARES *et al.*, 1997). *In vivo*, após administração de TLD observou-se menor síntese de TNF- $\alpha$  após o estímulo com LPS para induzir choque séptico (MOREIRA *et al.*, 1997).

Em nosso estudo, a TLD não inibiu IL-1 $\beta$  e KC, o que pode explicar o fato de TLD não ter reduzido a severidade da diarreia em nosso modelo experimental, já que IL-1 $\beta$  parece ser um estimulador primário da diarreia por inibir a absorção de água e cloreto (SARTOR, 1994; KREYDIYYEH; AL-SADI, 2002).

Em vários estudos, a inibição induzida por TLD mostrou ser específica para TNF- $\alpha$  (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; TAVARES *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2004). A literatura relata que a TLD não afetou os níveis de IL-1 $\beta$  (SAMPAIO *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1993; MOREIRA *et al.*, 1997; BAUDITZ *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004) e IL-8 (KIM *et al.*, 2004). Entretanto, outros estudos demonstraram que ela também suprime a produção de IL-12 em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), em monócitos humanos (MOLLER *et al.*, 1997) e em indivíduos com doença de Crohn (BAUDITZ *et al.*, 2002). Corral e Kaplan (1999) descrevem que a TLD tem um duplo efeito nos níveis de IL-12, reduzindo esta citocina quando PBMCs são estimulados por LPS, embora aumente quando estas células são ativadas via receptor de células T. *In vivo*, a TLD inibiu os níveis séricos TNF- $\alpha$  em 93% e IL-6 em 50%, bem como estimulou a produção de IL-10 (MOREIRA *et al.*, 1997).

Outro aspecto que deve ser destacado, é que a TLD não reduziu

significativamente a marcação de iNOS de acordo com os critérios de Yeoh *et al.* (2005), mostrando que a ativação de IL-1 $\beta$  pode um fator importante na expressão desta enzima, conforme já mencionado na literatura (GOMEZ-CAMBRONERO *et al.*, 2000).

Em nosso estudo, a TLD (15, 30 e 60 mg/kg) causou redução significativa do número de neutrófilos na mucosa intestinal dos animais sacrificados no sétimo dia, quantificados pela atividade da MPO. Assim, pode-se concluir que a TLD de alguma forma reduziu a resposta inflamatória local. Outras pesquisas relatam o efeito da TLD na quimiotaxia de leucócitos, que é o mecanismo responsável pelo influxo destas células no local do processo inflamatório (FAURE *et al.*, 1980; DUNZENDORFER *et al.*, 1997). Faure *et al.* (1980) verificaram que a pré-incubação de PMN com TLD inibiu significativamente a quimiotaxia. *In vitro*, Dunzendorfer *et al.* (1997) demonstraram que a TLD afetou citocinas e inibiu a transmigração de neutrófilos induzida por LPS através da ação direta nas células endoteliais. Em modelo de colite experimental, a TLD causou substancial redução da atividade de MPO na mucosa intestinal (MAZZON *et al.*, 2005), e reduziu a severidade dos sinais histológicos e de permeabilidade intestinal (MAZZON; CUZZOCREA, 2006).

Em modelos animais, várias pesquisas realizadas por nosso grupo demonstraram que a TLD possui potente ação antiinflamatória e analgésica. Verificou-se que a TLD reduziu o edema de pata induzida pela toxina da cólera (VIANA *et al.*, 2002), diminuiu as alterações macroscópicas e a neutrofilia na mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters (LIMA, 2004; LIMA *et al.*, 2005), e melhorou os aspectos histológicos da mucosa intestinal de ratos submetidos à mucosite induzida por MTX (LIMA, 2004). A TLD também mostrou reduzir a resposta contorciva induzida por ácido acético e zimosan (RIBEIRO *et al.*, 2000) e a incapacitação articular induzida por zimosan (VALE *et al.*, 2006).

Os estudos que abordam o efeito de TLD na diarreia induzida por CPT-11 são ainda controversos. Clinicamente tem-se demonstrado uma redução da toxicidade gastrointestinal do CPT-11 quando este é administrado em combinação com a TLD em pacientes com diagnóstico de câncer colorretal (GOVINDARAJAN, 2000; GOVINDARAJAN *et al.*, 2000; TCHEKMEDYIAN, 2002). Segundo Govindarajan *et al.* (2000), este efeito pode ser explicado pelo fato da TLD inibir a síntese de TNF- $\alpha$ , aumentar células responsáveis pela imunidade humoral e reduzir

a imunidade celular. A TLD pode ainda ter atividade na redução da secreção de cálcio e potássio pelo efeito direto da redução de TNF- $\alpha$  ou pela inibição da COX.

Em ratos, a TLD melhorou as lesões intestinais e inibiu a produção intestinal de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN- $\gamma$ ), o processo de apoptose e a diarreia induzida pelo CPT-11 (YANG *et al.*, 2006a). Outros estudos mostraram que a associação da TLD com CPT-11 melhora os sintomas da toxicidade gastrointestinal pela redução da conversão do CPT-11 em SN-38 e aumento da detoxificação do metabólito ativo (SN-38), via processo de glicuronidação (YANG *et al.*, 2006a; YANG *et al.*, 2006b). Entretanto Allegrini *et al.* (2006), em pacientes com diagnóstico de câncer avançado, observaram redução do metabolismo do CPT-11 e de SN-38 quando o CPT-11 foi administrado em associação com a TLD, mas não se observou redução significativa na incidência de diarreia.

Em relação ao efeito da TLD na variação ponderal, observou-se que este fármaco no protocolo aqui utilizado não reduziu, de forma estatisticamente significativa, a perda de massa corpórea dos animais com mucosite intestinal induzida pelo CPT-11. Era esperado que esta droga realmente não apresentasse efeito protetor na variação de massa corpórea, visto que ela não suprimiu a diarreia e nem o achatamento dos vilos nos animais submetidos à mucosite intestinal por CPT-11, fatores responsáveis pela desidratação e redução de absorção de nutrientes (DUNCAN; GRANT, 2003; SONIS *et al.*, 2004a; RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; AVRITSCHER *et al.*, 2004; GIBSON; KEEFE, 2006). Além disso, o efeito sedativo da TLD (CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001; MATTHEWS; MAcCOY, 2003) pode ter contribuído na redução da ingestão de alimentos e líquidos, sendo mais um fator agravante da perda de peso nestes animais. Contrariando estes resultados, em estudo clínico em pacientes com câncer colorretal recebendo quimioterapia com CPT-11, Govindarajan *et al.* (2000) mostraram que a associação de CPT-11 com TLD evitou a deterioração do estado nutricional decorrente dos efeitos tóxicos do CPT-11 no trato gastrointestinal, melhorando a qualidade de vida nestes pacientes. Experimentalmente, Lima (2004) não observou melhora de peso do tratamento com TLD em hamsters com mucosite oral e ratos com mucosite intestinal. Entretanto, Yang *et al.* (2006a) relatou que a TLD atenuou a perda de peso a partir do sexto dia experimental em ratos tratados com CPT-11.

Apesar de alguns estudos mostrarem ação positiva da TLD na proteção de estados caquéticos pelo seu efeito redutor de TNF- $\alpha$  (GOVINDARAJAN *et al.*, 2000;

MATTHEWS; MAcCOY, 2003), o papel exato da TLD na caquexia permanece pouco elucidado. Não existem relatos consistentes do efeito benéfico para a caquexia e seus sintomas associados quando o medicamento é administrado isoladamente (ZHOU *et al.*, 2002).

Em relação ao efeito da TLD nos níveis de leucócitos totais, evidenciou-se que esta não foi capaz de reverter significativamente a leucopenia induzida pelo tratamento com CPT-11. Esta condição descrita na literatura com uso de CPT-11 (ROSATI *et al.*, 2002; ENZINGER *et al.*, 2005) e observada por nós, possivelmente não foi prevenida com uso da TLD devido à sua própria capacidade de induzir leucopenia (CALABRESE; FLEISCHER Jr., 2000; MATTHEWS; McCOY, 2003). Este fato merece atenção, visto que a leucopenia é um fator de risco para infecções secundárias que podem provocar translocação bacteriana e septicemia (WOO *et al.*, 2000; SONIS, 2004; AVRITSCHER *et al.*, 2004).

Um outro aspecto avaliado foi o potencial da TLD em melhorar a sobrevivência de animais submetidos à mucosite intestinal por CPT-11. Nossos resultados mostraram que esta droga não foi capaz de reverter significativamente a mortalidade observada no modelo de mucosite, o que era esperado já que a TLD não teve um efeito protetor consistente nas lesões observadas e ainda, pelo fato desta droga potencializar o efeito leucopênico do CPT-11, conforme comentado anteriormente.

Pode-se concluir que a TLD apresentou no nosso estudo um efeito protetor moderado das alterações intestinais induzidas pelo CPT-11. Este fato nos leva a supor que a mucosite induzida pelo CPT-11 é um processo multifatorial, onde existe a participação de vários mediadores inflamatórios. Desta forma, TLD não se mostrou eficaz como tratamento da mucosite intestinal em camundongos *Swiss*, já que não reverteu o principal sintoma, a diarreia. O efeito positivo de PTX foi consistente pelo fato desta droga interferir nos níveis de todas estas citocinas. Assim, o efeito parcial da TLD foi pelo fato deste fármaco ser inibidor mais específico para TNF- $\alpha$  e mostra que IL-1 $\beta$  e KC são cruciais no desenvolvimento da lesão. Estes resultados sugerem que na resposta inflamatória induzida pelo CPT-11, a citocina inicialmente ativada é o TNF- $\alpha$  que induz a ativação de IL-1 $\beta$ , que juntos ativam KC e NO.

Sugere-se também que a resposta inflamatória da mucosite intestinal provocada pelo tratamento com CPT-11 pode ser acompanhada pela liberação de prostanoídes como PGE<sub>2</sub>. A biossíntese de PGs e TX a partir do ácido araquidônico

depende da ação da enzima COX (VANE, 1971; VANE *et al.*, 1990; VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002; VANE; BOTTING, 2003). A COX-1 está presente na maioria das células como enzima constitutiva, enquanto a COX-2 é uma enzima com expressão predominantemente no processo inflamatório, apesar de ser expressa em pequenas quantidades constitutivamente (VANE *et al.*, 1998; HINZ; BRUNE, 2002). No trato gastrointestinal, PGs são mediadores de vários processos fisiológicos e patológicos (TAN *et al.*, 2000; WALLACE, DEVCHAND, 2005; SHAO *et al.*, 2006).

No presente estudo verificou-se através de imunohistoquímica uma expressão aumentada de COX-2 associada à destruição histopatológica resultante do tratamento com CPT-11, confirmando a presença e o envolvimento das PGs na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11. As áreas de maior marcação de COX-2 correspondem às criptas e ao epitélio de revestimento. A especificidade da marcação de COX-2 nas criptas encontrada em nosso estudo é similar ao observado por outros autores (YEOH *et al.*, 2005). As criptas são zonas proliferativas do intestino (WILSON; GIBSON, 1997; MAHIDA *et al.*, 1997; STURM; DIGNASS, 2002). Existem evidências que a atividade de COX-2 é um fator importante nos mecanismos de proliferação intestinal e, portanto, possuem um papel na recuperação do epitélio intestinal (TAN *et al.*, 2000; WALLACE; DEVCHAND, 2005; SHAO *et al.*, 2006).

Em modelo animal, Sonis *et al.* (2004b) demonstraram que a radiação provoca *upregulation* de COX-2 nos fibroblastos e no endotélio vascular da mucosa oral e que a geração de COX-2 ocorre paralelamente com a formação de ulcerações. Observou-se ainda que a COX-2 parece não ser o condutor primário da mucosite oral, mas é agente amplificador da lesão, possivelmente aumentando a duração e/ou a severidade das lesões ulcerativas. É possível que isto ocorra via ativação de NF- $\kappa$ B, que tem papel também nos níveis de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Posteriormente, Logan *et al.* (2007) demonstraram que a expressão de NF- $\kappa$ B e COX-2 teve aumento significativo na mucosite oral de pacientes em tratamento com agentes quimioterápicos. Ao nível intestinal, Yeoh *et al.* (2005), analisando por imunohistoquímica a expressão de NF- $\kappa$ B e COX-2 no tecido colorretal de 28 pacientes com câncer, concluíram que a destruição histopatológica que ocorreu após o tratamento radioterápico acompanhou o aumento da expressão de NF- $\kappa$ B e COX-2.

Quanto ao papel das PGs na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11, alguns estudos têm apontado que a administração do CPT-11 associa-se ao

aumento da síntese de prostanóides, particularmente PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> que podem ser mediadores importantes na diarreia provocada por esta droga (SAKAI *et al.*, 1995 e 1997; KASE *et al.*, 1997, TRIFAN *et al.*, 2002).

Em cólon distal de ratos montado em câmaras de Üssing, Sakai *et al.* (1995 e 1997) demonstraram que o CPT-11 e o SN-38 aumentam a secreção de cloro, via ativação de eicosanóides. Observou-se também que a indometacina, os inibidores de TXA<sub>2</sub> sintase e os bloqueadores do receptor de TXA<sub>2</sub> foram efetivos no controle da secreção de cloro, demonstrando que TXA<sub>2</sub> parece ser um mediador importante no evento.

Deve-se salientar que embora similaridades existam entre os experimentos *in vitro* e *in vivo*, as condições são completamente distintas e as conclusões obtidas através dos resultados *in vitro* não podem ser totalmente aplicadas nos estudos *in vivo*, nos quais existem complexas interações celulares e humorais que afetam a expressão da resposta inflamatória. O modelo apresentado por Sakai *et al.* (1995, 1997) talvez se aplique mais consistentemente à diarreia precoce, desta forma, provavelmente o aumento de TXA<sub>2</sub> seja observado na gênese desta diarreia.

Confirmando esta hipótese, Kase *et al.* (1997) observaram que a diarreia precoce induzida pelo CPT-11 foi acompanhada pelo aumento de PGE<sub>2</sub> no cólon descendente e que a administração de atropina inibiu a sua ocorrência e normalizou os níveis de PGE<sub>2</sub>, entretanto, o uso de indometacina falhou no seu controle. O aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub> acompanhado de baixa absorção de água e eletrólitos no cólon também foi observado na diarreia tardia induzida pelo CPT-11. As alterações patológicas no trato intestinal acompanharam o aumento de PGE<sub>2</sub>, que parece estar envolvida na cicatrização da mucosa injuriada.

Em vista do envolvimento de PGs na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11, testou-se um inibidor seletivo para COX-2, o CLX. Nossos resultados demonstraram que o CLX nas doses utilizadas não reverteu significativamente o grau de diarreia, nem tampouco a infiltração neutrofilica provocada pelo tratamento com CPT-11. Além disso, o CLX não reduziu a leucopenia, a perda de massa corpórea e não alterou a taxa de sobrevivência dos animais tratados com CPT-11.

Analisando estes resultados em conjunto, pode-se concluir que o CLX não foi eficiente na prevenção e tratamento da mucosite intestinal no modelo por nós

testado. Este fato nos leva a supor que as doses utilizadas podem não terem sido suficientes para a redução significativa dos níveis de PGs sintetizadas via COX-2; ou que o papel das PGs na gênese do processo patológico tenham papel secundário e que outros mediadores inflamatórios sejam integrantes na cascata inflamatória. Por outro lado, existem evidências que a atividade de COX-2 é um fator importante nos mecanismos de proliferação intestinal e, conseqüentemente, esta atividade é importante nos mecanismos de reparo do epitélio intestinal (TAN *et al.*, 2000; WALLACE; DEVCHAND, 2005).

Observou-se também que o tratamento com o CLX não reduziu a marcação de COX-2, resultado compatível com outros estudos que mostram que o CLX inibe COX-2 através de uma ligação no sítio ativo da enzima e não envolve mecanismos que interfere em sua expressão (LEVI-ARI *et al.*, 2007).

Alguns estudos referem que PGs participam no curso evolutivo da mucosite oral (SONIS *et al.*, 2004a e 2004b; SONIS, 2004; LOGAN *et al.*, 2007) e mucosite intestinal (TRIFAN *et al.*, 2002; SAKAI *et al.*, 1995 e 1997; KASE *et al.*, 1997; YEOH *et al.*, 2005). No entanto, o bloqueio do processo por DAINES ainda apresenta resultados controversos.

Um estudo piloto avaliou o efeito do flurbiprofeno na mucosite induzida pela irradiação na região da cabeça e pescoço. Neste estudo não se observou diferença significativa na severidade ou na duração da evolução da mucosite nos grupos tratados e não-tratados com DAINES quando este foi administrado na semana anterior ao início da radioterapia. No entanto, pacientes que receberam o antiinflamatório por duas semanas após o início do tratamento apresentaram melhora significativa no grau de mucosite, demonstrando que a continuidade da terapia pode ser uma ferramenta importante para o controle da mucosite (STOKMAN *et al.*, 2005).

*In vivo*, Trifan *et al.* (2002) mostraram que a co-administração de um inibidor da COX-2 (CLX) com CPT-11 em ratos melhorou o seu efeito antitumoral, reduziu a severidade da diarreia provocada pela droga e diminuiu a perda de peso em ratos. No protocolo, a mucosite intestinal foi induzida através de duas doses de CPT-11 (150 mg/kg – i.v.), e o CLX foi testado nas doses de 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 50 e 150 mg/kg administrado diariamente durante oito dias consecutivos por gavagem. A redução da diarreia foi efetiva entre as doses de 10 a 50 mg/kg, sendo que a melhor resposta foi observada quando se utilizou a dose 30 mg/kg. Por outro lado, a indometacina, que é um inibidor seletivo de COX-1, não teve efeito antidiarréico em

nenhuma das doses testadas (1, 3 e 10 mg/kg). Observou-se também que o aumento da expressão de COX-2 é associado com o aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub> no cólon no quinto dia após o início do tratamento com CPT-11, confirmando o seu papel como mediador da diarreia tardia induzida pela droga. Pergunta-se, entretanto, por que neste modelo o CLX não foi eficaz nas doses maiores?

Duas explicações podem ser sugeridas para explicar a ineficácia do tratamento com CLX em altas doses. Primeiro, o CLX em altas concentrações provoca a ativação de NF- $\kappa$ B, que é fator de transcrição de genes pró-inflamatórios como COX-2 e TNF- $\alpha$  (NIEDERBERGER *et al.*, 2001). A outra explicação é abordada em alguns trabalhos recentes, que têm sugerido que a COX-2 também tem papel importante nos mecanismos de defesa e proteção da mucosa do trato gastrointestinal, modulando a habilidade de resistência e resposta a injúria, contribuindo significativamente para a resolução da inflamação do trato gastrointestinal (GRISHIN *et al.*, 2006; WALLACE; DEVCHAND, 2005).

Além disso, o uso de inibidores específicos de COX-2 associa-se com a incidência de colite isquêmica (RADAELLI *et al.*, 2005), que pode interferir no curso evolutivo da mucosite intestinal. TXA<sub>2</sub>, maior produto da COX-1, causa agregação plaquetária e vasoconstrição. Já a síntese de PGI<sub>2</sub>, largamente mediada por COX-2, é um potente inibidor plaquetário e agente vasodilator. Portanto, os inibidores específicos da COX-2 agem preferencialmente na inibição endotelial de PGI<sub>2</sub> sem a inibição da formação de TXA<sub>2</sub>, provocando um desbalanço entre ambos, que pode ser responsável pelo aumento de eventos tromboembólicos.

Em nosso laboratório, quando se estudou o efeito do CLX na mucosite intestinal induzida pelo MTX verificou-se que as doses menores (7,5 e 15 mg/kg) não promoveram proteção do epitélio intestinal. Por outro lado, a dose de 30 mg/kg apesar de ter se mostrado útil do ponto de vista morfológico não foi eficiente na prevenção dos danos (LIMA, 2004).

Analisando, portanto, os nossos resultados à luz dos mostrados por outros autores, fica evidente que a ineficácia observada com o uso de CLX encontrada em nosso estudo demonstra que a expressão aumentada de COX-2 induzida pelo CPT parece não ser o mecanismo principal da diarreia induzida pelo CPT-11, assim, provavelmente outros mediadores inflamatórios devem ser alvos mais centrais. Ressalte-se também que os estudos aqui discutidos utilizam ratos e o nosso

camundongo, o que pode explicar alguns aspectos discrepantes nos resultados apresentados.

A Figura 37 ilustra um modelo hipotético proposto, a luz dos resultados encontrados no presente trabalho, para a cascata dos mediadores inflamatórios envolvidos na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.

Por fim, sugere-se que as abordagens farmacológicas utilizadas no presente trabalho possam ser úteis em outros estudos experimentais e em protocolos clínicos de pacientes em terapia antineoplásica. A PTX por ter apresentado importante efeito protetor na mucosite induzida pelo CPT-11 torna-se importante alvo para outros estudos experimentais e clínicos prospectivos e randomizados, no sentido de se estabelecer a sua eficácia terapêutica em seres humanos.

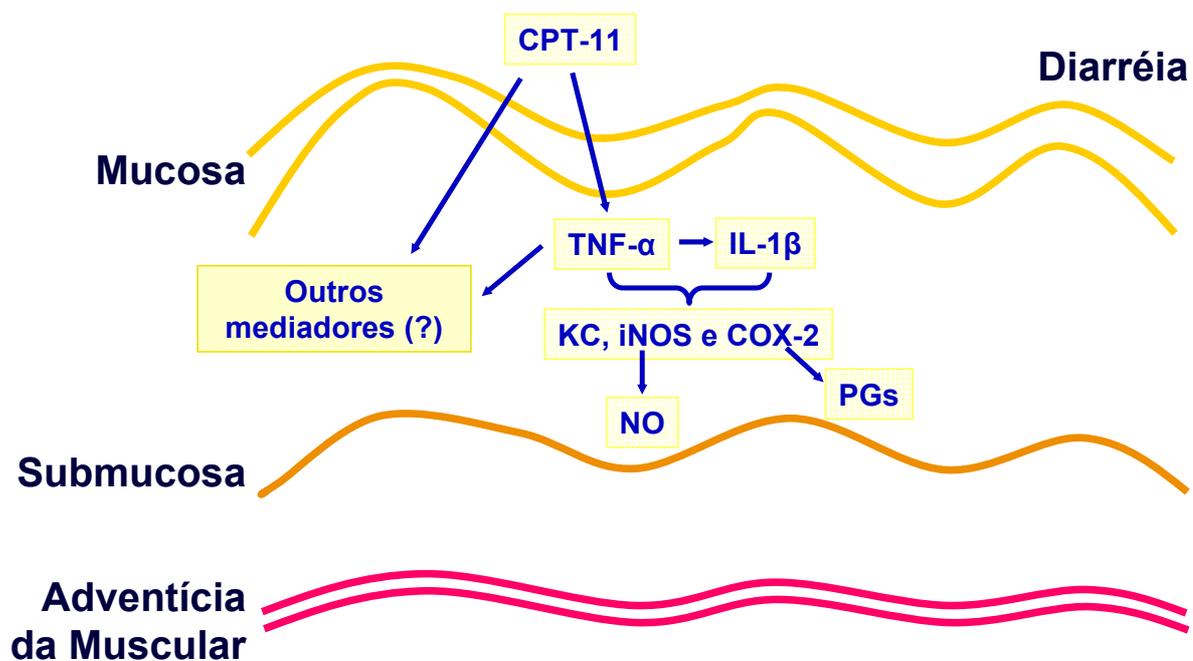


FIGURA 37 – Modelo hipotético proposto para a cascata dos mediadores inflamatórios envolvidos na mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.

## 5 CONCLUSÕES

Analisados em conjunto, nossos resultados permitem concluir especificamente que:

\_ No modelo de mucosite intestinal induzida por CPT-11, ora apresentado, foram observadas alterações morfológicas (achatamento das vilosidades), funcionais (diarréia com perda de peso) e histopatológicas (necrose parcial das criptas e infiltrado inflamatório).

\_ As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC parecem desempenhar um papel importante na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.

\_ NO e PGs parecem desempenhar um papel na fisiopatologia das alterações intestinais induzidas pelo CPT-11.

\_ A PTX preveniu significativamente as alterações morfo-funcionais (achatamento das vilosidades e diarréia) e histopatológicas (necrose das criptas e infiltrado inflamatório), tais efeitos parecem ser consequência de sua capacidade em inibir TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e iNOS.

\_ A TLD inibiu as alterações histológicas induzidas pelo CPT-11, sem, no entanto, interferir no curso da diarréia, provavelmente, por TNF- $\alpha$  não ser o único mediador inflamatório participante da patogênese da lesão.

\_ O CLX não apresentou nenhum efeito protetor na evolução da mucosite intestinal induzida pelo CPT-11.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, O. M. E.; BAIUOMY, A. R.; EL-SHENAWY, S. M.; ARBID, M. S. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 331-40, 2003.

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

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

AJANI, J. A. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. **Oncologist**, v. 10 (suppl.), p. 49-58, 2005.

AKARASEREENONT, P.; BAKHLE, Y. S.; THIEMERMANN, C.; VANE, J. R. Cytokine-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 by activation of tyrosine kinase in bovine endothelial cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, n. 3, p. 401-8, 1995.

ALLEGRI, G.; DI PAOLO, A.; CERRI, E.; CUPINI, S.; AMATORI, F.; MASI, G.; DANESI, R.; MARCUCCI, L.; BOCCI, G.; TACCA, M. D.; FALCONE, A. Irinotecan in combination with thalidomide in patients with advanced solid tumors: a clinical study with pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 58, p. 585-93, 2006.

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

APOSTOLIDOU, E.; ESTEY, E.; CORTES, J.; GARCIA-MANERO G.; FADERL, S. THOMAS, D.; TSIMBERIDOU, A.; KANTARIJIAN, H.; GILES, F. J. Mitoxantrone and prolonged infusion gemcitabine as salvage therapy in patients with acute myelogenous leukemia. **Leuk. Res.**, v. 27, n. 4, p. 301-4, 2003.

AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1445-51, 1991.

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

AVRITSCHER, E. B. C.; COOKSLEY, C. D.; ELTING, L. S. Scope and epidemiology of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Semin. Oncol. Nurs**, v. 20, n. 1, p. 3-10, 2004.

BARRACHINA, M. D.; PANÉS, J.; ESPLUGUES, J. V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. **Curr. Pharm. Des.**, v. 7, p. 31-48, 2001.

BAUDITZ, J.; WEDEL, S.; LOCHS, H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. **Gut**, v. 50, p. 196-200, 2002.

BENET, L. Z.; KROETZ, D. L.; SHEINER, L. B. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's – As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2003. seção 1, p. 3-20.

BESHAY, E.; CROZE, F.; PRUD'HOMME, G. J. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production *in vitro* and *in vivo*. **Clin. Immunol.**, v. 98, n. 2, p.272-9, 2001.

BIANCO, J. A; APPELBAUM, F. R.; NEMUNAITIS, J.; ALMGREN, J.; ANDREWS, F.; KETTNER, P.; SHIELDS, A.; SINGER, J. W. Phase I-II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant-related toxicities following bone marrow transplantation. **Blood**, v. 78, n.5, p.1205-11, 1991.

BOEHMER, C. H.; JAEGER, W. Capecitabine in treatment of platinum-resistant recurrent ovarian cancer. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 1A, p. 439-43, 2002.

BOKEMEYER, C.; HARTMANN, J. T. Oral and gastrointestinal toxicity. In: LIPP, H.-P. **Anticancer drug toxicity: prevention, management and clinical pharmacokinetics**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap. 4, p. 235-61.

BOMBINI, G.; CANETTI, C.; ROCHA, F. A. C.; CUNHA, F. Q. Tumour necrosis factor- $\alpha$  mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 496, p. 197-204, 2004.

BORNER, M. M.; DIETRICH, D.; STUPP, R.; MORANT, R.; HONEGGER, H.; WERNLI, M.; HERRMANN, R.; PESTALOZZI, B. C.; SALETTI, P.; HANSELMANN, S.; MULLER, S.; BRAUCHLI, P.; CASTIGLIONE-GERTSCH, M.; GOLDBIRSCHE, A.; ROTH, A. D. Phase II study of capecitabine and oxaliplatin in first and second-line treatment of advanced or metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 7, p. 1759-66, 2002.

BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Intestinal mucositis: the role of the Bcl-2 family, p53 and caspases in chemotherapy-induced damage. **Support. Care Cancer**, v. 14, n. 7, p. 713-31, 2006.

BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; CUMMINS, A. G.; TYSKIN, A. KEEFE, D. M. K. Irinotecan changes gene expression in the small intestine of the rat with breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 59, n. 3, p. 337-48, 2007.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-22, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria 344, 12 de maio de 1998**. Disponível em: <[http://www.msd.brazil.com/msdbrazil/corporate/about/press/legislacao/legis\\_8.html](http://www.msd.brazil.com/msdbrazil/corporate/about/press/legislacao/legis_8.html)>. Acesso em: 25 abr. 2006.

BÜLTZINGSLÖWEN, I.; BRENNAN, M. T.; SPIJKERVET, F. K. L.; LOGAN, R.; STRINGER, A.; RABER-DURLACHER, J. E.; KEEFE, D. Growth factors and cytokines in the prevention and treatment of oral and gastrointestinal mucositis. **Support. Care Cancer**, v. 14, p. 519-27, 2006.

CALABRESE, L.; FLEISCHER Jr., A. B. Thalidomide: current and potential clinical applications. **Am. J. Med.**, v. 108, p. 487-95, 2000.

CALABRESI, P.; CHABNER, B. A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINONOFF, P. B. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2003. s. 10, p. 1040-93.

CAO, S.; BLACK, J. D.; TROUTT, A. B.; RUSTUM, Y. M. Interleukin 15 offers selective protection from irinotecan-induced intestinal toxicity in a preclinical animal model. **Cancer Res.**, v. 58, p. 3270-4, 1998.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; SOUSA, M. L. P.; LIMA, A. A. M.; RIBEIRO, R. A. The effect of tumour necrosis factor (TNF) inhibitors in *Clostridium difficile* toxin-induced paw oedema and neutrophil migration. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 88, p. 313-8, 2001.

CARNEIRO-FILHO, B. A.; LIMA, L. P. F.; ARAÚJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G. H. P.; BRITO, G. A. C.; LIMA, V.; MONTEIRO, S. M. N.; SANTOS, F. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, n. 1, p. 65-72, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, n. 21, p. 13926-31, 2002.

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

CHOWBAY, B.; SHARMA, A.; ZHOU, Q.-Y.; CHEUNG, Y. B.; LEE, E. J. D. The modulation of irinotecan-induced diarrhoea and pharmacokinetics by three different classes of pharmacologic agents. **Oncol. Rep.**, v. 10, p. 745-51, 2003.

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

CLANCY, R. M.; AMIN, A. R.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 7, p.1141-51, 1998.

COOL, J. C.; DYER, J. L.; XIAN, C. J.; BUTLER, R. N.; GEIER, M. S.; HOWARTH, G. S. Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 15, p. 72-82, 2005.

CORRAL, L. G.; KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 58, suppl. 1, p. 1107-13, 1999.

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

CWILICH, R. G.; OLVERA, A. S.; PRIETO, A. V. Talidomida en cáncer avanzado: estudio en fase I. **Cir. & Cir.**, v. 69, n. 2, p. 62-7, 2001.

DAVIES, F. E.; RAJE, N.; HIDESHIMA, T.; LENTZSCH, S.; YOUNG, G.; TAI, Y.-T.; LIN, B.; PODAR, K.; GUPTA, D.; CHAUHAN, D.; TREON, S. P.; RICHARDSON, P. G.; SCHLOSSMAN, R. L.; MORGAN, G. J.; MULLER, G. W.; STIRLING, D. I.; ANDERSON, K. C. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. **Blood**, v. 98, n. 1, 2001.

DE KONING, B. A. E.; VAN DIEREN, J. M.; LINDENBERGH-KORTLEVE, D. J.; VAN DER SLUIS, M.; MATSUMOTO, T.; YAMAGUCHI, K.; EINERTHAND, A. W.; SAMSOM, J. N.; PIETERS, R.; NIEUWENHUIS, E. E. S. Contributions of mucosal immune cells to methotrexate-induced mucositis. **Int. Immunol.**, v. 24, p. 1-9, 2006.

D'HELLENCOURT, C. L.; DIAW, L.; CORNILLET, P.; GUENOUNOU, M. Differential regulation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\beta$  e IL-10 by pentoxifylline. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 18, n. 12, p. 739-48, 1996.

DIAZ, A.; CHEPENIK, K. P.; KORN, J. H.; REGINATO, A. M.; JIMENEZ, S. A. Differential regulation of cyclooxygenases 1 and 2 by interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and transforming growth factor- $\beta$ 1 in human lung fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, v. 241, p. 222-9, 1998.

DIJKSTRA, G.; VAN, G. H.; JANSEN, P. L.; MOSHAGE, H. Targeting nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 5, n. 5, p. 529-36, 2004.

DOHERTY, G. M. J. C.; JENSEN, H. R.; ALEXANDER, C. M.; BURESH, C. M.; NORTON, J. A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery**, v. 110, p. 192-98, 1991.

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

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

DODDS, H. M.; RIVORY, L. P. The mechanism for inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (CPT-11). **Mol. Pharmacol.**, v. 56, p. 1346-53, 1999.

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

DU, G.-J.; LIN, H.-H.; XU, Q.-T.; WANG, M.-W. Thalidomide inhibits growth of tumour through COX-2 degradation independent of antiangiogenesis. **Vascul. Pharmacol.**, v. 43, p. 112-9, 2005.

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

DUNZENDORFER, S.; SCHATZBERGER, P.; REINISCH, N.; KÄHLER, C. M.; WIEDERMANN, C. J. Effects of thalidomide on neutrophil respiratory burst, chemotaxis, and transmigration of cytokine- and endotoxin-activated endothelium. **Arch. Pharmacol.**, v. 356, p. 529-35, 1997.

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

ERIKSSON, T.; BJÖRKMAN, S.; HÖGLUND, P. Clinical pharmacology of thalidomide. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 57, p. 365-76, 2001.

FAURE, M.; THIVOLET, J.; GAUCHERAND, M. Inhibition of PMN leukocytes chemotaxis by thalidomide. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 269, p. 275-80, 1980.

FERRÀ, C.; DE SANJOSÉ, S.; LASTRA, C. F.; MARTÍ, F.; MARIÑO, E. L.; SUREDA, A.; BRUNET, S.; GALLARDO, D.; BERLANGA, J. J.; GARCÍA, J.; GRAÑENA, A. Pentoxifylline, ciprofloxacin and prednisone failed to prevent transplant-related toxicities in bone marrow transplant recipients and were associated with an increased incidence of infectious complications. **Bone Marrow Transplant.**, v. 20, p. 1075-80, 1997.

FONG, Y.; LOWRY, S. F. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 55, p. 157-70, 1990.

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

FUJITA, J.; MESTRE, J. R.; ZELDIS, J. B.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A. J. Thalidomide and its analogues inhibit lipopolysaccharide-mediated induction of cyclooxygenase-2. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 3349-55, 2001.

FUNK, J. O.; ERNST, M.; SCHÖNHARTING, M. M.; ZABEL, P. Pentoxifylline exerts synergistic immunomodulatory effects in combination with dexamethasone or cyclosporine A. **Int. J. Immunopharmac.**, v. 17, n. 12, p. 1007-16, 1995.

FURCHOGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-6, 1980.

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

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K.; CLARKE, J. M.; REGESTER, G. O.; THOMPSON, F. M.; GOLAND, G. J.; EDWARDS, B. G.; CUMMINS, A. G. The effect of keratinocyte growth factor on tumour growth and small intestinal mucositis after chemotherapy in the rat with breast cancer. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 50, p. 53-8, 2002a.

GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K.; TROMPSON, F. M.; CLARKE, J. M.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. G. Effect of interleukin-11 on ameliorating intestinal damage after methotrexate treatment of breast cancer in rats. **Dig. Dis. Sci.**, v. 47, n. 12, p. 2751-57, 2002b.

GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; INGLIS, M. R. B.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 18, p. 1095-100, 2003.

GIBSON, R. J.; BOWEN, J. M.; CUMMINS, A. G.; KEEFE, D. M. K. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. **Clin. Exp. Med.**, v. 4, p. 188-95, 2005.

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

GÓMEZ-CAMBRONERO, L.; CAMPS, B.; DE LA ASUNCIÓN, J. G.; CERDÁ, M.; PELLÍN, A.; PALLARDO, F. V.; CALVETE, J.; SWEIRY, J. H.; MANN, G. E.; VIÑA, J.; SASTRE, J. Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 293, n. 2, p. 670-6, 2000.

GOVINDARAJAN, R.; HEATON, K. M.; BROADWATER, R.; ZELTLIN, A.; LANG, N. P.; HAUER-JENSEN, M. Effect of thalidomide on gastrointestinal toxic effects of irinotecan. **Lancet**, v. 356, p. 566-7, 2000.

GOVINDARAJAN, R. Irinotecan and thalidomide in metastatic colorectal cancer. **Oncology**, v. 14, suppl. 13, p. 29-32, 2000.

GOWEN, M.; MacDONALD, B. R.; RUSSELL, R. G. G. Actions of recombinant human  $\gamma$ -interferon and tumor necrosis factor  $\alpha$  on the proliferation and osteoblastic characteristics of human trabecular bone cells *in vitro*. **Arthritis Rheum.**, v. 31, n. 12, p. 1500-07, 1988.

GRAPHPAD SOFTWARE. **Prism 4 for Windows**. Version 4.01, 2004. 1CD-ROM.

GRISHIN, A. V.; WANG, J.; POTOKA, D. A.; HACKAM, D. J.; UPPERMAN, J. S.; BOYLE, P.; ZAMORA, R.; FORD, H. R. Lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 in intestinal epithelium via a noncanonical p38 MAPK pathway. **J. Immunol.**, v. 176, n. 1, p. 580-8, 2006.

GROSCH, S.; MAIER, T. J.; SCHIFFMANN S.; GEISLINGER, G. Cyclooxygenase -2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **J. Natl. Cancer Int.**, v. 98, n. 11, p. 736-47, 2006.

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

GUTIERREZ-REYES, G.; LOPEZ-ORTAL, P.; SIXTOS, S.; CRUZ, S.; RAMIREZ-IGLESIAS, M. T.; GUTIERREZ-RUIZ, M. C.; SANCHEZ-AVILA, F.; ROLDAN, E.; VARGAS-VORACKOVA, F.; KERSHENOBICH, D. Effect of pentoxifylline on levels of pro-inflammatory cytokines during chronic hepatitis C. **Scand. J. Immunol.**, v. 63, n. 6, p. 461-7, 2006.

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

HADDAD, J. J.; LAND, S. C.; TARNOW-MORDI, W. O.; ZEMBALA, M.; KOWALCZYK, D.; LAUTERBACH, R. Immunopharmacological potential of selective phosphodiesterase inhibition. I. Differential regulation of lipopolysaccharide-mediated proinflammatory cytokine (interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$ ) biosynthesis in alveolar epithelial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 300, n. 2, p. 559-66, 2002.

HARSHA, W. T.; KALANDAROVA, E.; McNUTT, P.; IRWIN, R.; NOEL, J. Nutritional supplementation with transforming growth factor-beta, glutamine, and short chain fatty acids minimizes methotrexate-induced injury. **J. Pediatric. Gastroenterol. Nutr.**, v. 42, n. 1, p. 53-8, 2006.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2: 10 years later. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 300, n. 2, p.367-74, 2002.

HOWARTH, G. S. Insulin-like growth factor-I and gastrointestinal system: therapeutic indications and safety implications. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2109-12, 2003.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, n. 11, p. 1349-53, 1981.

HU, Z. P.; YANG, X. X.; CHAN, S. Y.; XU, A. L.; DUAN, W.; ZHU, Y. Z.; SHEU, F. S.; BOELSTERLI, U. A.; CHAN, E.; ZHANG, Q.; WANG, J. C.; EE, P. L. R.; KOH, H. L.; HUANG, M.; ZHOU, S. F. St. John's wort attenuates irinotecan-induced diarrhea via down-regulation of intestinal pro-inflammatory cytokines and inhibition of intestinal epithelial apoptosis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 216, n. 2, p. 225-37, 2006.

HUANG, F. S.; KEMP, C. J.; WILLIAMS, J. L.; ERWIN, C. R.; WARNER, B. W. Role of epidermal growth factor and its receptor in chemotherapy-induced intestinal injury. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 282, p. G432-42, 2002.

HUIZINGA, T. W.; DIJKMANS, B. A. C.; VAN DER VELDE, E. A.; VAN DE POUW KRAAN, T. C. T. M.; VERWEIJ, C. I.; BREEDVELD, F. C. An open study of pentoxifylline and thalidomide as adjuvant therapy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 55, n. 11, 1996.

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

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

JAKEMAN, P.; SMITH, W. C. S. Thalidomide in leprosy reaction. **Lancet**, v. 343, p. 432-3, 1994.

JANSMAN, F. G. A.; SLEIJFER, D. T.; GRAAF, J. C.; COENEN, J. L. L. M.; BROUWERS, J. R. B. J. Management of chemotherapy-induced adverse effects in the treatment of colorectal cancer. **Drug saf.**, v. 24, n. 5, 2001.

JEWETT, A.; BONAVIDA, B. Pentoxifylline suppresses interleukin-2-mediated activation of immature human natural killer cells by inhibiting endogenous tumor necrosis factor-alpha secretion. **J. Clin. Immunol.**, v. 14, n.1, p. 31-8, 1994.

JI, Q.; ZHANG, L.; JIA, H.; XU, J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 34, n. 4, p. 427-36, 2004.

KASE, Y.; HAYAKAWA, T.; TOGASHI, Y.; KAMATAKI, T. Relevance of irinotecan hydrochloride-induced diarrhea to the level of prostaglandin E<sub>2</sub> and water absorption of large intestine in rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 75, p. 399-405, 1997.

KEEFE, D. M. K.; BREALEY, J.; GOLAND, G. J.; CUMMINS, A. G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, v. 47, p. 632-7, 2000.

KEEFE, D. M. K.; GIBSON, R. J.; HAUER-JENSEN, M. Gastrointestinal mucositis. **Semin. Oncol. Nurs.**, v. 20, n. 1, p. 38-47, 2004.

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

KEEFE, D. M. K. Mucositis guidelines: what have they achieved, and where to from here? **Support. Care Cancer**, v. 14, n. 6, p. 489-91, 2006.

KEEFE, D. M.; SCHUBERT, M. M.; ELTING, L. S.; SONIS, S. T.; EPSTEIN, J. B.; RABER-DURLACHER, J. E.; MIGLIORATI, C. A.; McGUIRE, D. B.; HUTCHINS, R. D.; PETERSON, D. E. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, v. 109, p. 820-31, 2007.

KEIFER, J. A.; GUTTRIDGES, D. C.; ASHBURNER, B. P.; BALDWIN Jr., A. S. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by thalidomide through suppression of I $\kappa$ B kinase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 25, p. 22382-7, 2001.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v. 7, p. 2-10, 2001.

KIM, Y. S.; KIM, J. S.; JUNG, H. C.; SONG, I. S. The effects of thalidomide on the stimulation of NF- $\kappa$ B activity and TNF- $\alpha$  production by lipopolysaccharide in a human colonic epithelial cell line. **Mol. Cells.**, v. 17, n. 2, p. 210-6, 2004.

KLAUSNER, J. D.; FREEDMAN, V. H.; KAPLAN, G. Thalidomide as an anti-TNF- $\alpha$  inhibitor: implications for clinical use. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v. 81, n. 3, 1996.

KLIMBERG, V. S.; SOUBA, W. W.; DOLSON, D. J.; SALLOUM, R. M.; HAUTAMAKI, R. D.; PLUMLEY, D. A.; MENDENHALL, W. M.; BOVA, F. J.; KHAN, S. R.; HACKETT, R. L. Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. **Cancer**, v. 66, n. 1, p. 62-8, 1990.

KREYDIYYEH, S. I.; AL-SADI, R. The mechanism by which interleukin-1 beta reduces net fluid absorption from the rat colon. **Eur. Cytokine Netw.**, v. 13, n. 3, p. 358-63, 2002.

KUBES, P.; McCAFFERTY, D.M. Nitric oxid and intestinal inflammation. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 150-8, 2000.

KUNZ, W.; KELLER, H.; MUCKTER, H. N-phthalyl-glutamin-saure-imid: experimentelle untersuchungen an einem neuen synthetischen produkt mit sedativen eigenenschaften. **Arzneim. Fesch.**, v. 6, p. 426-30, 1956.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 46, p. 211-20, 2000.

LALLA, R. V.; SCHUBERT, M. M.; BENSADOUN, R.-J.; KEEFE, D. Anti-inflammatory agents in the management of alimentary mucositis. **Support. Care Cancer**, v. 14, p. 558-65, 2006.

LANGER, C. J. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. **Oncology**, v. 18, n. 7, s. 4, p. 17-28, 2004.

LARSEN, C. G.; ANDERSON, A. O.; OPPENHEIM, J. J.; MATSUSHIMA, K. Production of interleukin-8 by human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. **Immunology**, v. 68, p. 31-36, 1989.

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

LENFERS, B. H. M.; LOEFFLER, T. M.; DROEGE, C. M.; HAUSAMEN, T. U. Substantial activity of budesonide in patients with irinotecan (CPT-11) and 5-fluorouracil induced diarrhea and failure of loperamide treatment. **Ann. Oncol.**, v.10, p. 1251-53, 1999.

LEV-ARI, S.; KAZANOV, D.; LIBERMAN, E.; BEN-YOSEF, R.; ARBER, N. Down-regulation of PGE<sub>2</sub> by physiologic levels of celecoxib is not sufficient to induce apoptosis or inhibit cell proliferation in human colon carcinoma cell lines. **Dig. Dis. Sci.**, v. 52, p. 1128-33, 2007.

LIMA, V. **Efeito de moduladores da produção de prostaglandinas (celecoxib e indometacina) e de citocinas (pentoxifilina e talidomida) nas mucosites oral e intestinal induzidas por antineoplásicos em animais.** 2004. 200p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

LIMA, V.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA, M. L. P.; LEITÃO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of the tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 113, n. 3, p. 210-7, 2005.

LOGAN, R. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D. M. K. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in the oral mucosa following cancer chemotherapy. **Oral Oncol.**, v. 43, n. 4, p. 395-401, 2007.

McKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Intestinal epithelial function: the case for immunophysiological regulation. Cells and mediators (1). **Dig. Dis. Sci.**, v. 38, p. 1377-87, 1993.

MAHIDA, Y. R.; GALVIN, A. M.; GRAY, T.; MAKH, S.; McALINDON, M. E.; SEWELL, H. F.; PODOLSKY, D. K. Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 109, p. 377-86, 1997.

MAJUMDAR, S.; LAMOTHE, B.; AGGARWAL, B. B. Thalidomide suppresses NF- $\kappa$ B activation induced by TNF and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. **J. Immunol.**, v. 168, p. 2644-51, 2002.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; LAUTERBACH, R.; BOBEK, M. Differential effects of pentoxifylline, a non-specific phosphodiesterase inhibitor, on the production of IL-10, IL-12 p40 and p35 subunits by murine peritoneal macrophages. **Immunopharmacology**, v. 49, p. 335-43, 2000.

MARTICH, D.; DANNER, R. L.; CESKA, M. SUFFREDINI, A. F. Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal human after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 1021-4, 1991.

MATTHEWS, S. J.; McCOY, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. **Clin. Ther.**, v. 25, n. 2, p. 342-95, 2003.

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

MATTOX, T. W. Treatment of unintentional weight loss in patients with cancer. **Nutr. Clin. Pract.**, v. 20, n. 4, p. 400-10, 2005.

MAZZON, E.; MUIA, C.; DI PAOLA, R.; GENOVESE, T.; DE SARRO, A.; CUZZOCREA, S. Thalidomide treatment reduces colon injury induced by experimental colitis. **Shock**, v. 23, n. 6, p. 556-64, 2005.

MAZZON, E.; CUZZOCREA, S. Thalidomide treatment reduces the alteration of paracellular barrier function in mice ileum during experimental colitis. **Shock**, v. 25, n. 5, p. 515-21, 2006.

McHUGH, S. M.; RIFKIN, I. R.; DEIGHTON, J.; WILSON, A. B.; LACHMANN, P. J.; LOCKWOOD, C. M.; EWAN, P. W. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 99, n. 2, p. 160-7, 1995.

MISIRLIOGLU, C. H.; ERKAL, H.; ELGIN, Y.; UGUR, I.; ALTUNDAG, K. Effect of concomitant use of pentoxifylline and alpha-tocopherol with radiotherapy on the clinical outcome of patients with stage IIIB non-small cell lung cancer: a randomized prospective clinical trial. **Med. Oncol.**, v. 23, n. 2, p. 185-9, 2006.

MOLLER, D. R.; WYSOCKA, M.; GREENLEE, B. M.; MA, X.; WAHL, L.; FLOCKHART, D. A.; TRINCHIERI, G.; KARP, C. L. Inhibition of IL-12 production by thalidomide. **J. Immunol.**, v. 159, n. 10, p. 5157-61, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, A.; FURCHGOTT, R. International union of Pharmacology nomenclature in nitric oxide research. **Pharmacol. Rev.**, v. 49, n. 2, 1997.

MOREIRA, A. L.; SAMPAIO, E. P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K. A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor  $\alpha$  by enhancing mRNA degradation. **J. Exp. Med.**, v. 177, p. 1675-80, 1993.

MOREIRA, A. L.; WANG, J.; SARNO, E. N.; KAPLAN, G. Thalidomide protects mice against LPS-induced shock. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 10, p. 1199-207, 1997.

MOURA, R. A.; WADA, C. S.; PURCHIO, A.; ALMEIDA, T. V. Estudo dos elementos figurados do sangue. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998. cap. 32, p. 343-74.

MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA**, v. 286, n. 8, p. 954-9, 2001.

MYERS, M. J.; BAARSCH, M. J.; MURTAUGH, M. P. Effects of pentoxifylline on inflammatory cytokine expression and acute pleuropneumonia in swine. **Immunobiol.**, v. 205, p. 17-34, 2002.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Complicaciones gastrointestinales**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/cuidados-medicos-apoyo/complicacionesgastrointestinales/healthProfessional/page5>>. Acesso em: 10 abr. 2006.

NEUNER, P.; KLOSNER, E.; SCHAUER, E.; POURMOJIB, M.; MACHEINER, W.; GRÜNWARD, C.; KNOBLER, R.; SCHWARZ, A.; LUGER, T. A.; SCHWARZ, T. Pentoxifylline *in vivo* down-regulates the release of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor- $\alpha$  by human peripheral blood mononuclear cells. **Immunology**, v. 83, p. 262-7, 1994.

NICOLA, N. A. An introduction to the cytokines. In: \_\_\_\_\_. **Guidebook to cytokines and their receptors**. Oxford, New York: Oxford University Press, 1994, p. 1-7.

NIEDERBERGER, E.; TEGEDER, I.; VETTER, G.; SCHMIDTKO, A.; SCHMIDT, H.; EUCHENHOFER, C.; BRÄUTIGAM, L.; FRÖSCH, S.; GEISSLINGER, G. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF- $\kappa$ B. **FASEB J.**, v. 15, p. 1622-24, 2001.

OKUNO, S. H.; WOODHOUSE, C. O.; LOPRINZI, C. L.; SLOAN, J. A.; LAVASSEUR, B. I.; CLEMENS-SCHUTJER, D.; SWAN, D.; AXVIG, C.; EBBERT, L. P.; TIRONA, M. R.; MICHALAK, J. C.; PIERSON, N. Phase III controlled evaluation of glutamine for decreasing stomatitis in patients receiving fluorouracil (5-FU)-based chemotherapy. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 22, n. 3, p. 258-61, 1999.

ONOE, Y.; MIYAURA, C.; KAMINAKAYASHIKI, T.; NAGAI, Y.; NOGUCHI, K.; CHEN, Q. R.; SEO, H.; OHTA, H.; NOZAWA, S.; KUDO, I.; SUDA, T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblast. **J. Immunol.**, v. 156, n. 2, p. 758-64, 1996.

PALANCH, A. C. Metabolismo da glutamina no intestino. In: CURI, R. **Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. cap. 4, p. 85-96.

PALLADINO Jr., M. A.; FINKLE, B. S. Immunopharmacology of tumor necrosis factors  $\alpha$  e  $\beta$ . **Tips**, p388-9, 1986.

PAULSON, S. K.; VAUGHN, M. B.; JESSEN, S. M.; LAWAL, Y.; GRESK, C. J.; YAN, B.; MAZIASZ T. J.; COOK, C. S.; KARIM, A. Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 297, n. 2, 2001.

PEREZ, E. A. ; HILLMAN, D. W.; MAILLIARD, J. A.; INGLE, J. N.; RYAN, J. M.; FITCH, T. R.; ROWLAND, K. M.; KARDINAL, C. G.; KROOK, J. E.; KUGLER, J. W.; DAKHIL, S. R. Randomized phase II study of two irinotecan schedules for patients with metastatic breast cancer refractory to an anthracycline, a taxane, or both. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, n. 14, p. 2849- 55, 2004.

PETERSON D. E.; BECK, S. L.; KEEFE, D. M. K. Novel therapies. **Semin. Oncol. Nurs**, v. 20, n. 1, p. 53-8, 2004.

PETERSON, D. E.; KEEFE, D. M.; HUTCHINS, R. D.; SCHUBERT, M. M. Alimentary tract mucositis in cancer patients: impact of terminology and assessment on research and clinical practice. **Support. Care Cancer**, v. 14, n. 6, p. 499-504, 2006.

POHANKA, E.; SINZINGER, H. Effect of a single pentoxifylline administration on platelet sensitivity, plasma factor activity, plasma-6-oxo-PGF<sub>1</sub> alpha and thromboxane B<sub>2</sub> in health volunteers. **Prostaglandins Leukot. Med.**, v. 22, p. 191-200, 1986.

POTOKA, D. A.; NADLER, E. P.; UPPERMAN, J. S.; FORD, H. R. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. **World J. Surg.**, v. 26, p. 806-11, 2002.

PRITCHARD, D. M.; POTTEN, C. S.; HICKMAN, J. A. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. **Cancer Res.**, v. 58, n. 23, p. 5453-65, 1998.

RADAELLI, F.; FELTRI, M.; MEUCCI, G.; SPINZI, G.; TERRUZZI, V.; MINOLI, G. Ischemic colitis associated with rofecoxib. **Dig. Liver Dis.**, v. 37, p. 372-6, 2005.

RAJKUMAR, S. V.; FONSECA, R.; DISPENZIERI, A.; LACY, M. Q.; LUST, J. A.; WITZIG, T. E.; KYLE, R. A.; GERTZ, M. A.; GREIPP, P. R. Thalidomide in the treatment of relapsed multiple myeloma. **Mayo Clin. Proc.**, v. 75, n. 9, p. 897-901, 2000.

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

REAVES, T. A.; CHIN, A. C.; PARKOS, C. A. Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, suppl. I, p. 191-98, 2005.

REIMUND, J. M.; DUMONT, S.; MULLER, C. D.; KENNEY, J. S.; KEDINGER, M.; BAUMANN, R.; POINDRON, P.; DUCLOS, B. *In vitro* effects of oxpentifylline on inflammatory cytokine release in patients with inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 40, p. 475-80, 1997.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, p. 97-103, 2000.

RIBEIRO, R. A.; FREITAS, H. C.; CAMPOS, M. C.; SANTOS, C. C.; FIGUEIREDO, F. C.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. **J. Urol.**, v. 167, n. 5, p. 2229-34, 2002.

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

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

ROCHA-LIMA, C. M.; RIZVI, N. A.; ZHANG, C.; HERNDON 2nd, J. E.; CRAWFORD, J.; GOVINDAN, R.; KING, G. W.; GREEN, M. R. Randomized phase II trial of gemcitabine plus irinotecan or docetaxel in stage IIIB or stage IV NSCLC. **Ann. Oncol.**, v. 15, p. 410-8, 2004a.

ROCHA-LIMA, C. M.; GREEN, M. R.; ROTCHE, R.; MILLER Jr., W. H.; JEFFREY, G. M.; CISAR, L. A.; MORGANTI, A.; ORLANDO, N.; GRUIA, G.; MILLER, L. L. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. **J. Clin. Oncol.**, v. 22, n. 18, 2004b.

ROCHA, M. F. G.; SOARES, A. M.; FLORES, C. A.; STEINER, T. S.; LYERLY, D. M.; GUERRANT, R. L.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, A. A. M. Intestinal secretory factor released by macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin A: role of interleukin-1 $\beta$ . **Infect. Immun.**, v. 66, n. 10, p. 4910-6, 1998.

ROSATI, G.; ROSSI, A.; REGGIARDO, G.; MANZIONE, L. A phase II study of irinotecan alternated with a weekly schedule of high-dose leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil infusion in patients with metastatic colorectal cancer. **Oncology**, v. 62, n. 3, p. 209-15, 2002.

RUBENSTEIN, E. B.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; KEEFE, D.; McGUIRE, D.; EPSTEIN, J.; ELTING, L. S.; FOX, P. C.; COOKSLEY, C.; SONIS, S. T. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**, v. 100, suppl. 9, p. 2026-46, 2004.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C. J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 1265-75, 1995.

SAKAI, H.; DIENER, M.; GARTMANN, V., TAKEGUCHI, N. Eicosanoid-mediated Cl<sup>-</sup> secretion induced by the antitumor drug, irinotecan (CPT-11), in the rat colon. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 351, p. 309-14, 1995.

SAKAI, H.; SATO, T.; HAMADA, N.; YASUE, M.; IKARI, A.; KAKINOKI, B.; TAKEGUCHI, N. Thromboxane A<sub>2</sub>, released by the anti-tumor drug irinotecan, is a novel stimulator of Cl<sup>-</sup> secretion in isolated rat colon. **J. Physiol.**, v. 505, p. 133-44, 1997.

SAKAI, H.; SUZUKI, T.; MUROTA, M.; TAKAHASHI, Y.; TAKEGUCHI, N. Nitric oxide-induced Cl<sup>-</sup> secretion in isolated rat colon is mediated by the release of thromboxane A<sub>2</sub>. **J. Physiol.**, v. 543, n. 1, p. 261-71, 2002.

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

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

SALTZ, L. B. Understanding and managing chemotherapy-induced diarrhea. **J. Support. Oncol.**, v. 1, n. 1, p. 35-46, 2003.

SAMARDZIC, T.; JANKOVIC, V.; STOSIC-GRUJICIC, S.; POPADIC, D.; TRAJKOVIC, V. Pentoxifylline inhibits the syntesis and IFN- $\gamma$ -inducing activity of IL-18. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 124, p. 274-81, 2001.

SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N.; GALILLY, R.; COHN, Z. A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor  $\alpha$  production by stimulated human monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 173, p. 699-703, 1991.

SARNO, E. N.; GRAU, G. E.; VIEIRA, L. M. M.; NERY, J. A. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 $\beta$  during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 84, p. 103-8, 1991.

SARTOR, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. **Gastroenterology**, v. 106, p. 533-9, 1994.

SAVARESE, D.; AL-ZOULBI, A.; BOUCHER, J. Glutamine for irinotecan diarrhea. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, n. 2, p. 450-1, 2000.

SCHMIDT-CHOUDHURY, A.; FURUTA, G. T.; LAVIGNE, J. A.; GALLI, S. J.; WERSHIL, B. K. The regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  production in murine mast cells: pentoxifylline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF- $\alpha$  by distinct mechanisms. **Cell. Immunol.**, v. 171, p. 140-6, 1996.

SHAO, J.; SHENG, G. G.; MIFFLIN, R. C.; POWELL, D. W.; SHENG, H. Roles of myofibroblasts in prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 846-55, 2006.

SHEK, L. P. C.; LIM, D. L. C. Thalidomide in Behcet's disease. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, p. 31-5, 2002.

SHESKIN, J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 6, n. 3, p. 303-6, 1965.

SILVA, J. C. R.; ROCHA, M. F. G.; LIMA, A. A. M.; BRITO, G. A. C.; DE MENEZES, D. B.; RAO, V. S. N. Effects of pentoxifylline and nabumetone on the serum levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in rats with adjuvant arthritis. **Inflamm. Res.**, v. 49, p. 14-9, 2000.

SONIS, S. T.; PETERSON, R. L.; EDWARDS, L. J.; LUCEY, C. A.; WANG, L.; MASON, L.; LOGIN, G.; YMAMKAWA, M.; MOSES, G.; BOUCHARD, P.; HAYES, L. L.; BEDROSIAN, C.; DORNER, A. J. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 373-81, 2000.

SONIS, S. T. The biologic role for nuclear factor-kappaB in disease and its potential involvement in mucosal injury associated with anti-neoplastic therapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, n. 5, p. 380-9, 2002.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 277-84, 2004.

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

SONIS, S. T.; O'DONNELL, K. E.; POPAT, R.; BRAGDON, C.; PHELAN, S.; COCKS, D.; EPSTEIN, J. B. The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis. **Oral Oncol.**, v. 40, p. 170-6, 2004b.

SOUZA-FILHO, M. V. P.; LIMA, M. V. A.; POMPEU, M. M. L.; BALLEJO, G.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. **Am. J. Pathol.**, v. 150, n. 1, p. 247-56, 1997.

STOKMAN, M. A.; SPIJKERVET, F. K. L.; BURLAGE, F. R.; ROODENBURG, J. L. N. Clinical effects of flurbiprofen tooth patch on radiation-induced oral mucositis. A pilot study. **Support. Care Cancer**, v. 13, p. 42-8, 2005.

STRIETER, R. M.; REMICK, D. G.; WARD, P. A.; SPENGLER, R. N.; LYNCH III, J. P.; LARRICK, J.; KUNKEL, S. L. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. **Biochem Biophys. Res. Commun.**, v. 155, n. 3, p. 1230-6, 1988.

STURM, A.; DIGNASS, A. U. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. **Biochem. Biophys. Acta**, n. 1582, p. 282-8, 2002.

SULLIVAN, G. W.; CARPER, H. T.; NOVICK JR., W. J.; MANDELL, G. L. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 7, p. 1722-9, 1988.

SUZUKI, T.; SAKAI, H.; IKARI, A.; TAKEGUCHI, N. Inhibition of thromboxane A<sub>2</sub> – induced Cl<sup>-</sup> secretion by antidiarrhea drug loperamide in isolated rat colon. **Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 295, n. 1, p. 233-8, 2000.

TAKASUNA, K.; HAGIWARA, T.; HIROHASHI, M.; KATO, M.; NOMURA, M.; NAGAI, E.; YOKOI, T.; KAMATAKI, T. Inhibition of intestinal microflora glucuronidase modifies the distribution of the active metabolite of the antitumor agent, irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 42, p. 280-86, 1998.

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

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

TAMURA, T.; YASUTAKE, K.; NISHISAKI, H.; NAKASHIMA, T.; HORITA, K.; HIROHATA, S.; ISHII, A.; HAMANO, K.; AOYAMA, N.; SHIRASAKA, D.; KAMIGAKI, T.; KASUGA, M. Prevention of irinotecan-induced diarrhea by oral sodium bicarbonate and influence on pharmacokinetics. **Oncology**, v. 67, p. 327-37, 2004.

TAN, X.-D.; CHEN, Y.-H.; LIU, Q.-P.; GONZALEZ-CRUSSI, F.; LIU, X.-L. Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 2149-55, 2000.

TAVARES, J. L.; WANGOO, A.; DILWORTH, P.; MARSHALL, B.; KOTECHA, S.; SHAW, R. J. Thalidomide reduces tumour necrosis factor- $\alpha$  production by human alveolar macrophages. **Respir. Med.**, v. 91, p. 31-9, 1997.

TCHEKMEDYIAN, N. S. Thalidomide and irinotecan-associated diarrhea (letter). **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 3, p.234, 2002.

TEO, S. K. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. **AAPS J.**, v. 7, n. 1, 2005.

THEODOROU, V.; EUTAMENE, H.; FIORAMONTI, J.; JUNIEN, J. L.; BUENO, L. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1493-1500, 1994.

THOMAZZI, S. M.; RIBEIRO, R. A.; CAMPOS, D. I.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages. **Mediat. Inflamm.**, v. 6, p. 195-200, 1997.

THORNBERRY, N. A. Caspases: key mediators of apoptosis. **Chem. Biol.**, v. 5, p. R97-R103, 1998.

TRIFAN, O. C.; DURHAM, W. F.; SALAZAR, V. S.; HORTON, J.; LEVINE, B. D.; ZWEIFEL, B. S.; DAVIS, T. W.; MASFERRER, J. L. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Res.**, v. 62, n. 20, p. 5778-84, 2002.

U. S. A. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press, Washington, DC, 1996.

U. S. A. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **NIH image**. Disponível em: <<http://www.rsb.info.nih.gov/nih-image>>. Acesso em: 10 mai. 2005.

VALE, M. L.; CUNHA, F. Q.; BRITO, G. A.; BENEVIDES, V. M.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; RIBEIRO, R. A. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 536, n. 3, p. 309-17, 2006.

VAMVAKAS, L.; KAKOLYRIS, S.; KOUROUSSIS, C. KANDILIS, K.; MAVROUDIS, D.; ZIRAS, N.; ANDROULAKIS, N.; KALBAKIS, K.; SAARA, E.; SOUGLAKOS, J.; GEORGOULIAS, V. Irinotecan (CPT-11) in combination with infusional 5-fluorouracil and leucovorin (de gramont regimen) as first-line treatment in patients with advanced colorectal cancer: a multicenter phase II study. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 1, p. 65-70, 2002.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat. New Biol.**, v. 231, n. 25, p. 232-5, 1971.

VANE, J. R.; FLOWER, R. J.; BOTTING, R. M. History of aspirin and its mechanism of action. **Stroke**, v. 21, suppl. IV, p. IV.12-IV.23, 1990.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thromb. Res.**, v. 110, n. 5-6, p. 255-8, 2003.

VAN FURTH, A. M.; VERHARD-SEIJMONBERGEN, E. M.; VAN FURTH, R.; LANGERMANS, J. A. M. Effect of lisofylline and pentoxifylline on the bacterial-stimulated production of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 by human leucocytes. **Immunology**, v. 91, p. 193-6, 1997.

VAN'T LAND, B.; VAN BEEK, N. M. A.; VAN DEN BERG, J. J. M.; M'RABET, L. Lactoferrin reduces methotrexate-induced small intestinal damage, possibly through inhibition of GLP-2-mediated epithelial cell proliferation. **Dig. Dis. Sci.**, v. 49, n. 3, p. 425-33, 2004.

VERBON, A.; JUFFERMANS, N. P.; SPEELMAN, P.; VAN DEVENTER, S. J. H.; TEN BERGE, I. J. M.; GUCHELAAR, H.-J.; VAN DER POLL, T. A single oral dose of thalidomide enhances the capacity of lymphocytes to secrete gamma interferon in healthy humans. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, n. 9, p. 2286-90, 2000.

VIANA, C. F. G.; MELO, D. H.; CARNEIRO FILHO, B. A.; MICHELIN, M. A.; BRITO, G. A. C.; CUNHA, F. Q.; LIMA, A. A. M.; RIBEIRO, R. A. Pro-inflammatory effects of cholera toxin: role of tumor necrosis factor alpha. **Toxicon**, v. 40, p. 1487-94, 2002.

VILLALONA-CALERO, M.; SCHAAF, L.; PHILIPS, G.; OTTERSON, G.; PANICO, K.; DUAN, W.; KLEIBER, B.; SHAH, M.; YOUNG, D.; WAN-HONG, W.; KUHN, J. Thalidomide and celecoxib as potential modulators of irinotecan's activity in cancer patients. **Cancer Chemoth. Pharmacol.**, v. 59, p. 23-33, 2007.

VOGELSANG, G. B.; HESS, A. D.; FRIEDMAN, K. J.; SANTOS, G. W. Therapy of chronic graft-versus-host-disease. **Blood**, v. 74, p. 507-11, 1989.

WADE, C. M.; DALY, M. Genetic variation in laboratory mice. **Nat. Genet.**, v. 37, n. 11, p. 1175-80, 2005.

WALLACE, J. L.; DEVCHAND, P. R. Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense. **Br. J. Pharmacol.**, v. 145, p. 275-82, 2005.

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

WARD, A.; CLISSOLD, S. P. Pentoxifylline: a review of its pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*, v. 34, p. 50-97, 1987.

WILLIAMS, D. A. Inflammatory cytokines and mucosal injury. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v. 29, p. 26-30, 2001.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*, v. 355, p. 646-8, 2000.

WILSON, A. J.; GIBSON, P. R. Epithelial migration in the colon: filling in the gaps. *Clin. Sci.*, v. 93, p. 97-108, 1997.

WOO, P. C. Y.; NG, W. F.; LEUNG, H. C. H. TSOI, H. W.; YUEN, K. Y. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. *Pharmacol. Res.*, v. 41, n. 5, p. 526-32, 2000.

XIAN, C. J.; HOWARTH, G. S.; MARDELL, C. E.; COOL, J. C.; FAMILARI, M.; READ, L. C.; GIRAUD, A. S. Temporal changes in TFF3 expression and jejunal morphology during methotrexate-induced damage and repair. *Am. J. Physiol.*, v. 277, p. G785-95, 1999.

XIAN, C. J.; COUPER, R.; HOWARTH, G. S.; READ, L. C.; KALLINCOS, N. C. Increased expression of HGF and c-met in rat small intestine during recovery from methotrexate-induced mucositis. *Br. J. Cancer*, v. 82, n. 4, p. 945-52, 2000.

XIAN, C. J. Roles of growth factors in chemotherapy-induced intestinal mucosal damage repair. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, v. 4, n. 4, p. 260-9, 2003.

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

YANG, X. X.; HU, Z. P.; XU, A. L.; DUAN, W.; ZHU, Y. Z.; HUANG, M.; SHEU, F. S.; ZHANG, Q.; BIAN, J. S.; CHAN, E.; LI, X.; WANG, J. C.; ZHOU, S. F. A mechanistic study on reduced toxicity of irinotecan by coadministered thalidomide, a tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 319, n. 1, p. 82-104, 2006a.

YANG, X. X.; HU, Z. P.; CHAN, S. Y.; DUAN, W.; HO, P. C.; BOELSTERLI, U. A.; NG, K. Y.; CHAN, E.; BIAN, J. S.; CHEN, Y. Z.; HUANG, M.; ZHOU, S. F. Pharmacokinetic mechanisms for reduced toxicity of irinotecan by coadministered thalidomide. *Curr. Drug. Metab.*, v. 7, n. 4, p. 431-55, 2006b.

YEOH, A. S. J.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; KEEFE, D. M. K. Nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, v. 63, n. 5, p. 1295-1303, 2005.

ZHOU, S.; KESTELL, P.; TINGLE, M. D.; PAXTON, J. W. Thalidomide in cancer treatment: a potential role in the elderly? *Drugs Aging*, v. 19, n. 2, p. 85-100, 2002.

ZIDAN, J.; HAIM, N.; BENY, A.; STEIN, M.; GEZ, E.; KUTEN, A. Octreotide in the treatment of severe chemotherapy-induced diarrhea. **Ann. Oncol.**, v. 12, p. 227-9, 2001.