



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

ROBERTO CÉSAR PEREIRA LIMA JÚNIOR

**ESTUDO MORFOFUNCIONAL E DOS MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO
(CPT-11) EM CAMUNDONGOS: PAPEL DA CASPASE-1,
INTERLEUCINA-18 E ÓXIDO NÍTRICO**

FORTALEZA-CE

2008

ROBERTO CÉSAR PEREIRA LIMA JÚNIOR

**ESTUDO MORFOFUNCIONAL E DOS MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO (CPT-
11) EM CAMUNDONGOS: PAPEL DA CASPASE-1,
INTERLEUCINA-18 E ÓXIDO NÍTRICO.**

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

Orientador (a):

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA-CE

2008

ROBERTO CÉSAR PEREIRA LIMA JÚNIOR

**ESTUDO MORFOFUNCIONAL E DOS MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA
MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO (CPT-
11) EM CAMUNDONGOS: PAPEL DA CASPASE-1,
INTERLEUCINA-18 E ÓXIDO NÍTRICO**

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial da referida Universidade.

Data de aprovação: 11/07/2008

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Cláudio de Azevedo Canetti
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará-UFC

Ao bom Deus, por sempre olhar por mim e por me fazer tomar as melhores decisões em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais Roberto César Pereira Lima e Maria Aureana Costa Lima, e aos meus irmãos Denis Roberto e Marina Lima pelo imprescindível apoio nos momentos de maior dificuldade e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Ao grande amigo e orientador Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pela enorme e indubitável confiança depositada em mim desde meu ingresso na família LAFICA, a qual conduz com maestria.

Ao Prof. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza por interceder por mim no meu momento de maior dificuldade durante o curso de doutorado, pelo amigo que nele encontrei, disponibilidade e pelas valiosas sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Fernando de Queiróz Cunha pela presteza, disponibilidade e por me receber com tanta satisfação em seu laboratório na FMRP/USP, permitindo o desenvolvimento deste trabalho de grande qualidade.

À Profa. Gerly Anne de Castro Brito, pessoa extremamente gentil que sempre me transmitiu grande paz interior e pelas indispensáveis análises histopatológicas realizadas nesse trabalho.

A todos os amigos do LAFICA, especialmente Adriana Lima, André Luiz, Antoniella Gomes, Caroline Addison, Jand-Venes, Profa. Mariana Vale, Mirlane Cardoso, Pedro Soares, Renata Leitão, Renata Bessa por me fazerem sentir em casa desde que cheguei ao laboratório.

Ao amigo Helano Carioca pela colaboração e pelas discussões extremamente construtivas para aperfeiçoamento desse trabalho.

Aos amigos Rosemayre Freire e Caio Azevedo pelos muitos momentos de descontração na “Padoca” após os dias de árduo trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Samuel Miranda, Lorena Rodrigues, Leandro Linhares, Lorena Nunes, Raphael Marques, Raul Medeiros pela amizade, pelo constante aprendizado que tive com todos eles e pelo enorme interesse científico.

Aos inestimáveis e indispensáveis técnicos José Ivan (morfologia) e Vandinha França Pinheiro (LAFICA) pela grande organização e pelos excelentes profissionais que são. Uma referência!

Ao técnicos Ana Kátia dos Santos, Diva Amábile Montanha de Souza, Eliana Beatriz de Barros, Fabíola Leslie Mestriner, Giuliana Bertozzi Francisco, Ieda Regina dos Santos Schivo, Júlio Anselmo, Maria Inês Nemoto, Sérgio Roberto Rosa, Tadeu Franco Vieira, todos da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto pelo suporte experimental e pelo companheirismo no tempo que passei nessa bela cidade.

À minha querida Deysi Viviana por conferir a mim momentos de grande tranquilidade durante a fase mais complicada do meu doutorado.

Aos companheiros do LPN pela amizade e permanente incentivo.

À secretária Aura Rhanes Yida pela atenção e gentileza com que sempre me atendeu quaisquer que fossem minhas necessidades em relação à pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia: Haroldo, Carlos, Íris, Chiquinho, Fernando, Joana, Alana, pela indispensável ajuda na manutenção das atividades do departamento.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

**“O rio atinge seus objetivos
porque aprendeu a contornar
obstáculos.” (Lao-Tsé)**

RESUMO

ESTUDO MORFOFUNCIONAL E DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR IRINOTECANO (CPT-11) EM CAMUNDONGOS: PAPEL DA CASPASE-1, INTERLEUCINA-18 E ÓXIDO NÍTRICO. Autor: Roberto César Pereira Lima Júnior. Doutorado em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Defesa: 11 de julho de 2008. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Introdução: A Mucosite Intestinal (MI) e a diarreia severas são efeitos colaterais frequentes (15-25%) e limitantes da quimioterapia do câncer de cólon com Irinotecano (CPT-11). Até o presente momento, pouco se conhece sobre a fisiopatologia da MI. **Objetivo:** Estudar os mecanismos e mediadores envolvidos na mucosite intestinal induzida por CPT-11, verificando a participação da protease caspase-1, das citocinas interleucina-1 (IL-1), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-33 (IL-33), do óxido nítrico, de mediadores 5-lipoxigenase e do PAF, assim como a sequência de interação entre esses mediadores sob aspectos da resposta inflamatória e morfofuncionais. **Métodos:** Camundongos Swiss, C57BL/6 (BL), BALB/c (BC) ou *knockout* para Caspase-1 (Casp^{-/-}), IL-18 (IL-18^{-/-}), óxido nítrico sintase induzida (iNOS^{-/-}), 5-Lipoxigenase (5-LOX^{-/-}), receptor para PAF (PAFr^{-/-}) machos, 22 g, foram divididos em grupos (n=4-5) e tratados por 4 dias com salina (5 mL/kg, i.p) ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p) ou foram pré-tratados com IL-18bp (proteína ligante de IL18, 200 µg/animal/4 dias, i.p.), aminoguanidina (AG, 50 mg/kg, s.c, 2x/dia/4 dias), IL-33 (1 µg/animal/4 dias, i.v, 1h antes do CPT-11) ou loperamida ([4x3 mg/kg e 4x30 mg/kg]/animal, s.c.) em associação com CPT-11. No 5º dia, avaliou-se a diarreia por escores, o leucograma e, após sacrifício, coletou-se o duodeno para dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO, neutrófilos/mg tecido) e de óxido nítrico sintase induzida (iNOS pM citrulina/h/mg proteína), morfometria (razão vilo/cripta) e contratilidade *in vitro* à Acetilcolina (%contração em relação ao KCl60 mM). Para análise estatística utilizou-se ANOVA/Newman-Keuls ou Kruskal Wallis/Dunn. P<0,05 foi aceito. **Resultados:** Camundongos BL apresentaram um padrão de mucosite intestinal similar ao observado no camundongo Swiss sob aspectos morfofuncionais. O CPT-11 induziu leucopenia em todos os animais independentemente do tratamento aplicado. Adicionalmente, o CPT-11 induziu em animais BL e BC, não tratados, aumento de MPO intestinal, redução da relação vilo/cripta, aumento da contratilidade *in vitro* e dos eventos de diarreia comparados com animais injetados somente com salina (p<0,05). Apesar da administração de CPT-11, animais Caspase-1^{-/-}, IL-18^{-/-} ou BC tratados com IL-18bp apresentaram atividade de MPO e de iNOS reduzidas, bem como aumento na relação vilo/cripta, menor contratilidade duodenal *in vitro* e eventos de diarreia atenuados em comparação aos respectivos controles tratados com salina (p>0,05). Dados idênticos também foram observados em camundongos injetados com IL-33 e que receberam CPT-11. A redução na atividade de iNOS naqueles animais motivou o estudo do efeito do CPT-11 em animais iNOS^{-/-} ou tratados com aminoguanidina. Observaram-se menores níveis de citocinas IL-1β e KC, bem como uma atividade de MPO reduzida no duodeno desses animais. Além disso, verificou-se preservação da relação vilo/cripta e da espessura da camada muscular, menor contratilidade duodenal *in vitro* e eventos de diarreia atenuados similar ao observado nos respectivos controles que receberam apenas salina (p>0,05). Porém, a administração de CPT-11 a animais PAFr^{-/-} foi capaz de induzir alterações morfofuncionais e o aumento da atividade de MPO intestinal. Em camundongos 5-LOX^{-/-} ou tratados com loperamida (controle positivo), ambos os grupos injetados com CPT-11, observaram-se aumento da atividade de MPO e alterações morfométricas. Contudo, sobre aspectos funcionais de contratilidade *in vitro*, visualizou-se proteção. **Conclusões:** Esses resultados sugerem que a via caspase-1-IL-18-óxido nítrico contribui para o desenvolvimento da resposta inflamatória e alterações morfofuncionais na mucosite intestinal induzida por CPT-11. A IL-33 parece ser um fator protetor compensatório nessa cascata inflamatória. A 5-LOX e o PAFr parecem ter papel secundário na patogênese da mucosite intestinal por CPT-11.

Palavras-chave: CPT-11, inflamação, mucosite, citocinas, óxido nítrico.

ABSTRACT

MORPHOFUNCTIONAL STUDY AND THE INFLAMMATORY MEDIATORS INVOLVED ON THE PATHOGENESIS OF IRINOTECAN (CPT-11)-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE: ROLE OF CASPASE-1, INTERLEUKIN-18 AND NITRIC OXIDE. Author: Roberto César Pereira Lima Júnior. Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Defense: July 11th 2008. Advised by Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Introduction: Severe Intestinal Mucositis (IM) and diarrhea are frequent and dose-limiting side-effects of colon cancer chemotherapy with irinotecan (CPT-11). At present, much of IM pathophysiology remains unknown. **Aims:** To study the mechanisms and inflammatory mediators involved in CPT-11-induced intestinal mucositis, verifying the role of the protease caspase-1, cytokines interleukin-1 (IL-1), interleukin-18 (IL-18) and interleukin-33 (IL-33), nitric oxide, 5-lipoxygenase and PAF as well as the sequence of activation of these mediators in the inflammatory response and morphofunctional contexts. **Methods:** Swiss, C57BL/6 (BL), BALB/c (BC) male mice or caspases-1(Casp-1^{-/-}), IL-18 (IL-18^{-/-}), inducible nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}), 5-Lipoxygenase (5-LOX^{-/-}), PAF receptor (PAFr^{-/-}) *knockout* mice, 22g, were divided into groups (n=4-5) and treated for 4 days with saline (5 mL/kg, i.p.) or CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) or were given IL-18bp (IL-18 binding protein, 200 µg/animal/4 days, i.p.), aminoguanidine (AG, 50 mg/kg, s.c, 2x/day/4 days), IL-33 (1 µg/animal/4 days, i.v, 1h previously CPT-11) or loperamide ([4x3 mg/kg and 4x30 mg/kg]/animal, s.c.) co-administered with CPT-11. On day 5, diarrhea and leukocyte counts were assessed, and following sacrifice duodenal portions of the animal were collected to assess myeloperoxidase (MPO, neutrophils/mg tissue) and nitric oxide synthase (iNOS pM citruline /h/mg protein) activity, morphometric analysis, and *in vitro* contractility (%contraction in relation to KCl 60 mM). ANOVA/Newman Keuls or Kruskal Wallis/Dunn were used as statistical tests. P<0.05 was accepted. **Results:** IM was morphofunctionally similar in both BL and Swiss. CPT-11 induced leukopenia in all animal lineages despite the treatment given. Additionally, CPT-11 induced MPO, increased *in vitro* contractility and diarrheic events, and villi/crypt ratio reduction in BL and BC mice in comparison with saline treated mice (p<0.05). Despite the injection of CPT-11, Casp-1^{-/-}, IL-18^{-/-} or IL-18bp treated BC mice presented reduced MPO and iNOS activities and also increased villi/crypt ratio, reduced duodenal *in vitro* contractility and mild diarrhea similar to saline-treated mice (P>0.05), similar to the patterns seen in IL-33 treated mice. The reduced iNOS activity found in the earlier mice led us to investigate the CPT-11 effect on iNOS^{-/-} and aminoguanidine-treated mice. Lower IL-1β and KC cytokine levels, as well as reduced MPO activity were found. Also, preserved villi/crypt ratio and muscle layer thickness, normal duodenal contractility and diarrheic events were seen similarly to saline-treated mice (p>0.05). However, CPT-11-treated PAFr^{-/-} presented morphofunctional alterations and increased intestinal MPO activity. 5-LOX^{-/-} or loperamide treated mice (positive control), both injected with CPT-11, exhibited increased MPO activity and morphometric alterations, but no exacerbation on *in vitro* contractility was observable. **Conclusion:** Taken together, these results suggest the role of caspase-1/Interleukin-18/nitric oxide cascade on pathogenesis of CPT-11-induced morphofunctional alteration and inflammatory response (IM). IL-33 seems to be a compensatory protective factor on this inflammatory cascade. 5-LOX and PAFr show a likely secondary role on IM pathophysiology.

Keywords: CPT-11, inflammation, mucositis, cytokines, nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regulação das vias de sinalização de citocinas da família da interleucina-1 (IL-1)	26
Figura 2	<i>Camptotheca acuminata</i>	33
Figura 3	Estrutura da Camptotecina e do Topotecano	34
Figura 4	Estrutura do Irinotecano	34
Figura 5	Metabolismo do CPT-11	36
Figura 6	Detalhes estruturais de produtos do metabolismo do irinotecano.	37
Figura 7	Representação esquemática de sintomas e alterações clínicas da mucosite gastrointestinal	39
Figura 8	Esquema de injeção do CPT-11	48
Figura 9	Representação dos graus de diarreia pós-injeção do CPT-11	52
Figura 10	Esquema de avaliação funcional intestinal <i>in vitro</i>	53
Figura 11	Fotomicrografias do duodeno de camundongos Swiss injetados com salina 0,9% ou CPT-11	59
Figura 12	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos Swiss	61
Figura 13	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos Swiss	62
Figura 14	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos Swiss	64
Figura 15	Fotomicrografias do duodeno de camundongos C57BL/6 injetados com salina 0,9% ou CPT-11	66
Figura 16	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos C57BL/6	68
Figura 17	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos C57BL/6	69
Figura 18	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos C57BL/6	71

Figura 19	Fotomicrografias do duodeno de camundongos Caspase-1 ^{-/-} injetados com salina 0,9% ou CPT-11	74
Figura 20	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos Caspase-1 ^{-/-}	76
Figura 21	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos Caspase-1 ^{-/-}	77
Figura 22	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de iNOS duodenal em camundongos caspase-1 ^{-/-}	78
Figura 23	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos caspase-1 ^{-/-}	79
Figura 24	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos Caspase-1 ^{-/-}	81
Figura 25	Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com IL-1Ra e injetados com salina ou CPT-11	83
Figura 26	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com IL-1Ra	85
Figura 27	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com IL-1Ra	86
Figura 28	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos tratados com IL-1Ra	87
Figura 29	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com IL-1Ra	89
Figura 30	Fotomicrografias do duodeno de camundongos IL-18 ^{-/-} injetados com salina 0,9% ou CPT-11	92
Figura 31	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos IL-18 ^{-/-}	94
Figura 32	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos IL-18 ^{-/-}	95
Figura 33	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de iNOS duodenal em camundongos IL-18 ^{-/-}	96
Figura 34	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos IL-18 ^{-/-}	97
Figura 35	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos IL-18 ^{-/-}	99

Figura 36	Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com IL-18bp e injetados com salina ou CPT-11	102
Figura 37	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com IL-18bp	104
Figura 38	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com IL-18bp	105
Figura 39	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de iNOS duodenal em camundongos tratados com IL-18bp	106
Figura 40	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos tratados com IL-18bp	107
Figura 41	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com IL-18bp	109
Figura 42	Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com IL-33 e injetados com salina ou CPT-11	112
Figura 43	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com IL-33	114
Figura 44	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com IL-33	115
Figura 45	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos tratados com IL-33	116
Figura 46	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com IL-33	118
Figura 47	Fotomicrografias do duodeno de camundongos iNOS ^{-/-} injetados com salina 0,9% ou CPT-11	121
Figura 48	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos iNOS ^{-/-}	123
Figura 49	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos iNOS ^{-/-}	124
Figura 50	Efeito do CPT-11 sobre a marcação imunohistoquímica para iNOS duodenal em camundongos iNOS ^{-/-}	126
Figura 51	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos iNOS ^{-/-}	127

Figura 52	Efeito do CPT-11 sobre a espessura da camada muscular duodenal de camundongos iNOS ^{-/-}	129
Figura 53	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos iNOS ^{-/-}	130
Figura 54	Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com aminoguanidina e injetados com salina ou CPT-11	133
Figura 55	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com aminoguanidina	135
Figura 56	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com aminoguanidina	136
Figura 57	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos tratados com aminoguanidina	137
Figura 58	Efeito do CPT-11 sobre a espessura da camada muscular duodenal de camundongos tratados com aminoguanidina	139
Figura 59	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com aminoguanidina	140
Figura 60	Fotomicrografias do duodeno de camundongos 5-LOX ^{-/-} injetados com salina 0,9% ou CPT-11	142
Figura 61	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos 5-Lox ^{-/-}	144
Figura 62	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos 5-Lox ^{-/-}	145
Figura 63	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos 5-Lox ^{-/-}	146
Figura 64	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos 5-Lox ^{-/-}	147
Figura 65	Fotomicrografias do duodeno de camundongos PAFr ^{-/-} injetados com salina 0,9% ou CPT-11	149
Figura 66	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos PAFr ^{-/-}	151
Figura 67	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase	152

em duodeno de camundongos PAFr^{-/-}

Figura 68	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos PAFr ^{-/-}	153
Figura 69	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos PAFr ^{-/-}	154
Figura 70	Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com loperamida e injetados com salina ou CPT-11	156
Figura 71	Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com Loperamida	158
Figura 72	Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com loperamida	159
Figura 73	Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal <i>in vitro</i> em camundongos loperamida	160
Figura 74	Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com loperamida	162
Figura 75	Modelo hipotético proposto da patogênese da mucosite intestinal induzida pelo tratamento com CPT-11	182

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	Crêterios comuns de terminologia para eventos adversos (versão 3.0) Diarréia	40
Tabela 2	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos Swiss	60
Tabela 3	Avalia�o da diarréia em camundongos Swiss	63
Tabela 4	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos C57BL/6	67
Tabela 5	Avalia�o da diarréia em camundongos C57BL/6	70
Tabela 6	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos caspase-1^{-/-}	75
Tabela 7	Avalia�o da diarréia em camundongos caspase-1^{-/-}	80
Tabela 8	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com IL-1Ra	84
Tabela 9	Avalia�o da diarréia em camundongos tratados com IL-1Ra	88
Tabela 10	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos IL-18^{-/-}	93
Tabela 11	Avalia�o da diarréia em camundongos IL-18^{-/-}	98
Tabela 12	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com IL-18bp	103
Tabela 13	Avalia�o da diarréia em camundongos tratados com IL-18bp	108
Tabela 14	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com IL-33	113
Tabela 15	Avalia�o da diarréia em camundongos tratados com IL-33	117
Tabela 16	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos iNOS^{-/-}	122
Tabela 17	Efeito do CPT-11 sobre os níveis duodenais de citocinas em camundongos iNOS^{-/-}	125

Tabela 18	Avaliação da diarreia em camundongos iNOS^{-/-}	128
Tabela 19	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com aminoguanidina	134
Tabela 20	Avaliação da diarreia em camundongos tratados com aminoguanidina	138
Tabela 21	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos 5-LOX^{-/-}	143
Tabela 22	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos PAFr^{-/-}	150
Tabela 23	Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com loperamida	157
Tabela 24	Avaliação da diarreia em camundongos tratados com loperamida	161
Quadro 1	Quadro resumitivo dos achados experimentais	180

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
5-LOX	5-Lipoxigenase
ACh	Acetilcolina
AMP	Adenosina Monofostato
BALB/c	Camundongos da espécie BALB/c
BCh	Betanecol
C57BL/6	Camundongos da espécie C57BL/6
CE	Colinesterase
c-fos	proto-oncogene c-fos
c-jun	proto-oncogene c-jun
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPT-11	Irinotecano
DTT	Di-tiotreitol
EGTA	ácido etilenoglicol tetracético
ERK	Extracellular signal-regulated kinase (família da MAPK)
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FLAP	proteína ativadora da 5-lipoxigenase
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ICE	Enzima conversora de interleucina
IFN- γ	Interferon γ
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IL-11	Interleucina-11
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1Ra	Antagonista do receptor da Interleucina-1
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-18	Interleucina-18

IL-18bp	proteína ligante de Interleucina-18
IL-1F11	11º membro da família da Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-33	Interleucina-33
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
JNK	Quinase do N- terminal de C-Jun (família da MAPK)
KC	quimiocina derivada de queratinócito
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginina Metil Éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC ₄	Leutotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
M	Molar
MAPK	Proteínas Quinase Ativadas por Mitógenos
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPO	Enzima mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase

O ₂	Oxigênio
P38	membro da família MAPK
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PAFr	Receptor para fator de ativação de plaquetas
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoreto
Pró-IL-1	Pró-interleucina-1
Pro-IL-18	Pró-interleucina-18
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
s.c.	Subcutânea
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotecina (metabólito do Irinotecano)
ST2	receptor para IL-33
STAT-6	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 6)
Th1	linfócitos T auxiliares 1
Th2	linfócitos T auxiliares 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRAF	Fator Associado ao Receptor de TNF
WT	Wild type (tipo selvagem)
UGT1A1	uridina 5'-difosfato-glicuronosil-transferase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Trato gastrointestinal: considerações iniciais	22
1.2. Inflamação	22
1.3. Mediadores inflamatórios	23
1.3.1. Caspase-1 e citocinas da família IL-1	23
1.3.2. Óxido nítrico	29
1.3.3. PAF e 5-LOX.....	30
1.4. Camptotecinas: Descrição e história natural da camptoteca	33
1.5. Irinotecano	35
1.6. Mucosite: epidemiologia e fases de desenvolvimento	38
1.7. Mucosite intestinal por antineoplásicos	43
1.8. JUSTIFICATIVA	45
2. OBJETIVOS	47
2.1. Objetivos gerais	47
2.2. Objetivos específicos	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. Padronização da mucosite intestinal	48
3.3. Parâmetros avaliados na mucosite intestinal	51
3.3.1. Avaliação de parâmetro hematológico	51
3.3.2. Avaliação do grau da diarreia apresentada.....	51
3.3.3. Avaliação da contratilidade <i>in vitro</i> de duodeno	52
3.3.4. Análise histopatológica e Morfometria da mucosa intestinal	54
3.3.5. Ensaio de mieloperoxidase (MPO).....	54
3.3.6. Dosagem de citocinas IL-1 e KC	55
3.3.7. Determinação da atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS)	56
3.3.8. Análise estatística	57
4. RESULTADOS	58
4.1. Curva de definição de dose em camundongos Swiss	58
4.2. Curva de definição de dose em camundongos C57BL/6	65

4.3. Avaliação da participação da caspase-1 na mucosite induzida por CPT-11	72
4.4. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) sobre a mucosite induzida por CPT-11	82
4.5. Avaliação da participação da IL-18 na mucosite induzida por CPT-11	90
4.6. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com a proteína ligante de IL-18 (IL-18bp) sobre a mucosite induzida por CPT-11	100
4.7. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com a interleucina-33 (IL-33) sobre a mucosite induzida por CPT-11	110
4.8. avaliação da participação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosite intestinal induzida por CPT-11	119
4.8.1. Estudo em camundongos <i>knockout</i> para iNOS	119
4.8.2. Modulação farmacológica da atividade de iNOS com aminoguanidina	131
4.9. Avaliação da participação da 5-lipoxigenase (5-LOX) na mucosite induzida por CPT-11	141
4.10. Avaliação da participação do receptor para PAF (PAFr) na mucosite induzida por CPT-11	148
4.11. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com cloridrato de loperamida (LOP) sobre a mucosite induzida por CPT-11	155
5. DISCUSSÃO	163
6. CONCLUSÕES	181
7. REFERÊNCIAS.....	183

1. INTRODUÇÃO

1.1. Trato gastrintestinal: considerações iniciais

A monocamada epitelial intestinal forma uma barreira a uma complexa gama de fatores externos incluindo microorganismos, antígenos, alimentos e a grandes quantidades de enzimas digestivas. Essa superfície do trato gastrintestinal é composta de tipos celulares variados, como, por exemplo, epitélio colunar (enterócitos e colonócitos), células caliciformes, células enteroendócrinas e de Paneth. A camada mucosa de mamíferos em geral apresenta uma alta capacidade de renovação, ocorrendo uma troca completa dos tipos celulares de revestimento a cada 24 a 96 horas (Lipkin et al, 1963 apud Göke, Podolsky, 1996). Desta forma, o perfeito equilíbrio entre a perda celular e a capacidade proliferativa permite que haja preservação estrutural e integridade funcional da superfície epitelial celular. Na vigência de um evento lesivo, como erosões de mucosa, doença inflamatória intestinal, exposição a agentes infecciosos e/ou toxinas, isquemia, agentes quimioterápicos e radiação, a eficiente capacidade de renovação tecidual se faz importante.

1.2. Inflamação

No trato gastrintestinal, o processo inflamatório é um componente chave na defesa da mucosa. Uma resposta inflamatória adequada a agentes externos e internos evita o agravamento de lesões e permite o desenvolvimento de um processo de reparo igualmente adequado. Contudo, o comprometimento dessa resposta, ou seu prolongamento, pode contribuir para complicar o quadro lesivo instalado e, conseqüentemente, os sintomas associados. Em geral, a resposta é coordenada pelos mediadores liberados por células epiteliais e da lâmina própria como, por exemplo, mastócitos, linfócitos, neurônios e fibroblastos (Martin, Wallace, 2006).

A inflamação e a ativação do sistema imune no trato gastrintestinal levam à alteração da função motora que pode algumas vezes persistir após a resolução da resposta inflamatória na mucosa. Mudanças na função motora secundárias a diversos estímulos inflamatórios têm sido descritas em modelos

experimentais incluindo infecção (Vallance *et al.*, 1998; Bercik *et al.*, 2002), irritação química (Myers *et al.*, 1997) e ativação da resposta imune (Radojevic *et al.*, 1999). No contexto da infecção, mudanças na função motora têm sido associadas à defesa do hospedeiro para, desta forma, tentar expulsar o agente infeccioso. Em enfoques clínicos, algumas desordens de motilidade têm sido associadas à ativação imune, variando de casos leves a graves de síndrome do intestino irritável (Chadwick *et al.*, 2002; Tornblom *et al.*, 2002) a casos de pseudo-obstrução intestinal (Di Lorenzo, 1999). O conhecimento dos mecanismos envolvendo mudanças na função motora associadas à ativação do sistema imune se faz necessário, não somente em termos de fisiopatologia, mas também como forma de introdução de novas abordagens terapêuticas.

1.3. Mediadores inflamatórios

1.3.1. Caspase-1 e citocinas da família IL-1

As caspases constituem uma família de cisteína proteases que ocupam uma posição crítica nas cascatas de transdução de sinais associadas com respostas imunes. Em muitas dessas situações, a ativação de caspases culmina em apoptose (morte celular programada) das células nas quais essas proteases são ativadas. Por exemplo, linfócitos T citotóxicos e células *natural killer* (NK) eliminam células transformadas ou infectadas por vírus através de mecanismos pró-apoptóticos. Contudo, as caspases também exercem um importante papel nas reações imunes, culminando com a produção de citocinas. É bem conhecido que a caspase-1 (ou enzima conversora de interleucina-1 β (IL-1 β), ICE) é essencial para a ativação de IL-1 α , IL-1 β e IL-18 no contexto da ativação de reações inflamatórias pelo LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano (Creagh *et al.*, 2003). A caspase-1 foi originalmente identificada após tentativas de se purificar a enzima responsável pelo processamento da citocina pró-inflamatória IL-1 β . A caspase-1 cliva (ativação proteolítica) a pró-IL-1 β e a pró-IL18, formas inativas dessas citocinas, liberando as formas ativas, IL-1 β e IL-18, respectivamente (Thornberry *et al.*, 1992).

O papel da caspase-1 tem sido caracterizado em muitos modelos de inflamação *in vivo*. Ao nível intestinal, em modelos de doença inflamatória intestinal, McAllindon e colaboradores (1998) demonstraram que macrófagos, obtidos de cólon de humanos sem lesão inflamatória e posteriormente incubados com LPS, somente expressavam o precursor da IL-1 β , visto que não apresentavam caspase-1 ativa. Contudo, tendo em vista a ativação da caspase-1 em macrófagos coletados de pacientes com doença inflamatória intestinal, verificou-se a expressão e liberação da forma ativa da IL-1 β , de uma maneira similar a monócitos circulantes. Em outro modelo de lesão intestinal, colite crônica induzida por DSS (Dextran Sulphate Sodium), animais *knockout* para caspase-1 desenvolveram um grau atenuado de colite experimental, com menor ativação celular verificada em líquido linfonodal mesentérico, além de significativa redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-18, Interferon- γ (IFN- γ) e IL-1 β no cólon (Siegmund et al., 2001).

A interleucina-1 (IL-1) foi uma das primeiras citocinas a serem descobertas, apresentando participação central na rede de citocinas, controlando funções importantes no sistema imune durante infecções, no processo inflamatório, diferenciação celular, remodelação tecidual e morte celular. A IL-1 existe em duas isoformas, α e β . Ambas reconhecem os mesmos receptores de superfície e compartilham várias atividades. Paralelamente aos efeitos biológicos benéficos, a IL-1 participa da fisiopatologia de muitas doenças intestinais, como na doença inflamatória intestinal, lesão por isquemia reperfusão, enterites e síndrome do intestino irritável (Dinarello, 1996; Spiller *et al.*, 2000). A IL-1 β (**figura 1**) está envolvida, por exemplo, na ativação da via NF- κ B e na indução da expressão de moléculas de adesão nas fases iniciais da resposta inflamatória (Dinarello, 2000). Vias de controle à ação da IL-1 β inclui o inibidor natural IL-1Ra (antagonista do receptor de IL-1), capaz de competir com a IL-1 pelo receptor, modulando, desta forma, os efeitos pró-inflamatórios dessa citocina (Dinarello, 1996)

Os níveis teciduais de IL-1 β e TNF- α se mostraram significativamente elevados em modelos animais de mucosite oral induzida por radiação (Sonis *et al.*, 2000) e de mucosite intestinal induzida por irinotecano (Melo et al., 2008).

Além disso, a IL-1 β e o IFN- γ parecem estar envolvidos na fase de cicatrização da mucosite oral e intestinal revelando a complexa participação que essas citocinas possuem no desenvolvimento do processo inflamatório associado à fisiopatologia dessas doenças (Blijlevens, Sonis, 2007). Contudo, a literatura ainda carece de informações precisas sobre o verdadeiro papel da IL-1 β no contexto da gênese e/ou resolução da mucosite.

A interleucina-18 (IL-18), um membro da superfamília da citocina IL-1, foi inicialmente denominada fator de indução de interferon γ (IFN- γ), exercendo um importante papel na regulação de respostas imunes (Okamura et al., 1995; Nakanishi et al, 2001). É uma citocina com capacidade de induzir respostas de padrão Th1 e Th2 dependendo do contexto imunológico. A IL-18 exerce ações características de outras citocinas pró-inflamatórias (**figura 1**), como o aumento da expressão de moléculas de adesão, óxido nítrico sintase e produção de quimiocinas (Dinarello, 2006)

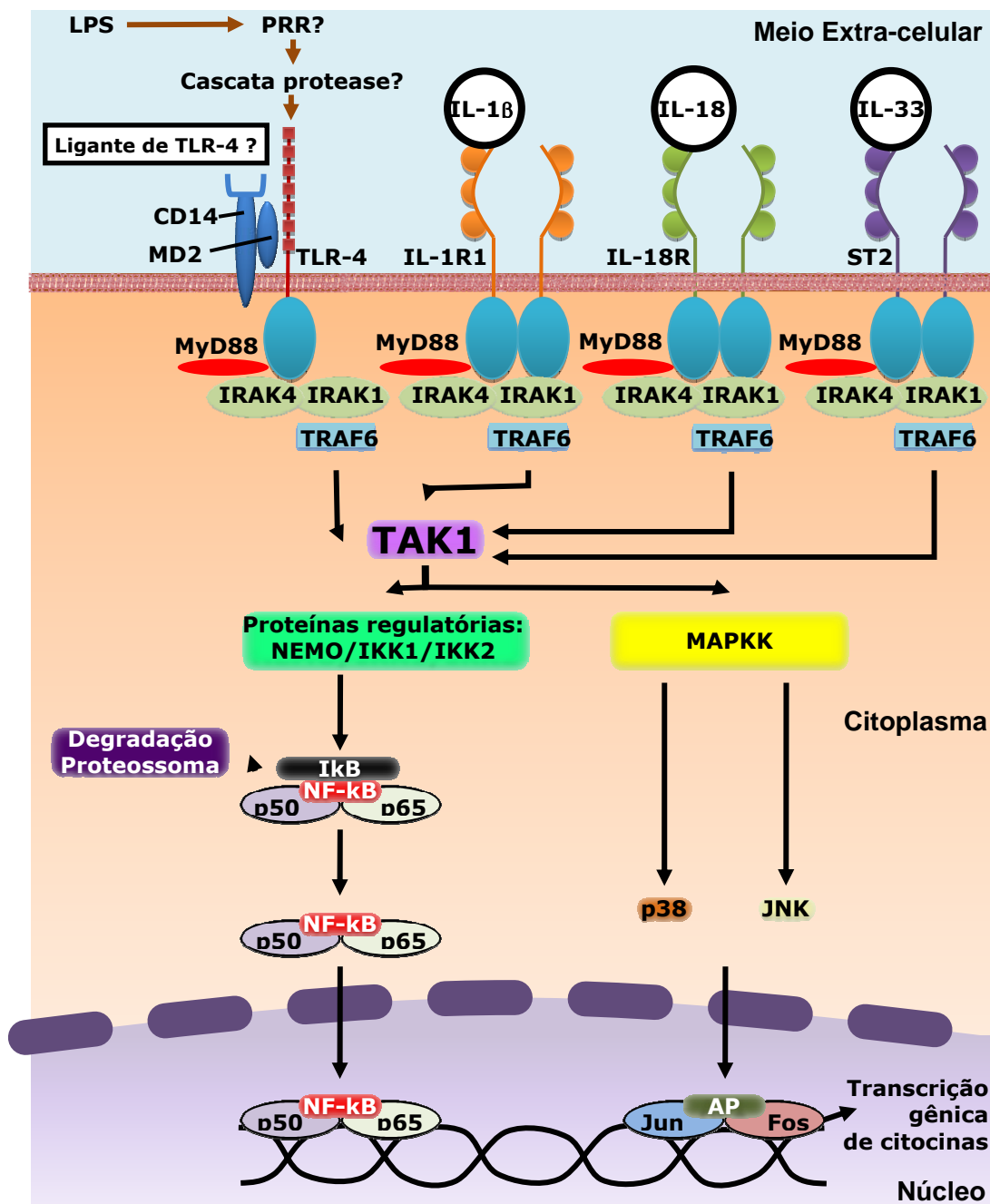


Figura 1 – Regulação das vias de sinalização de citocinas da família da interleucina-1 (IL-1). As citocinas da família IL-1 ativam alvos celulares através de receptores estruturalmente relacionados (família IL-1R/ Receptores Toll-like (TLR)) e vias de sinalização intracelular comuns, culminando com ativação de NF-κB. Em mamíferos não está claro se o LPS é um ligante direto de TLR-4 (ou CD14 em um complexo com MD2), ou se ele ativa uma cascata de proteases via PRR que por sua vez levaria à ativação de um ligante para TLR-4. O processo inflamatório e a ativação do sistema imune aumentam a expressão de IL-1 e IL-18, que ativam respectivamente os receptores IL-1R1 e IL-18R. Paralelamente, tem-se a ativação de IL-33, que se liga ao receptor ST2, até pouco tempo descrito como receptor órfão e expresso primariamente em matócitos e linfócitos Th2, regulando desta forma a função dessas células. O tratamento de animais com anticorpos anti-ST2 levam ao aumento da

resposta tipo Th1, sugerindo que o desequilíbrio de ação entre as vias Th1 e Th2 favorece o desenvolvimento de patologias específicas para uma via imunológica. Há grande similaridade de seqüência de ativação desde MyD88, IRAK4 e TRAF-6. Ligantes de citocinas e desses receptores atuam como reguladores endógenos sobre a ativação dessas vias (por exemplo, IL-1Ra e IL-18bp). Outras vias de ativação em mamíferos envolvem a ativação de quinases de p38. Abreviações: MyD88: proteína de diferenciação mielóide 88; IRAK1/4: quinase 1/4 ativadora de IL-1R; TRAF6: fator 6 associado ao receptor de fator de necrose tumoral (TNF); TAK1: quinase 1 associada ao fator de crescimento transformador (TGF- β); NEMO: modulador essencial do fator nuclear κ B (NF- κ B); I κ B: inibidor do NF- κ B; IKK1/2: quinase 1/2 do I κ B; MAPKK: quinase da proteína quinase ativada por mitógeno; JNK: quinase do n-terminal do c-jun (adaptado de Harbsky et al., 2007).

Os monócitos, macrófagos e células dendríticas são fontes primárias de IL-18. Em análise imunohistoquímica, Takeuchi e colaboradores (1997) mostraram a localização citoplasmática de IL-18 em células epiteliais intestinais de camundongos adultos em condições fisiológicas, indicando que o precursor é expresso constitutivamente, possivelmente exercendo papel importante na indução da resposta imune na mucosa intestinal. Em outro estudo, detectou-se a liberação de IL-18 por células epiteliais da cavidade oral de humanos após a exposição ao LPS bacteriano, IFN- γ e proteinase-3. Interessantemente, essas células não expressam caspase-1 (Sugawara, 2001).

As similaridades estruturais entre pró-IL-1 e pró-IL-18 e a clivagem de ambas as moléculas pela caspase-1 intracelular sugerem que estas podem ser ativadas por proteases extracelulares estruturalmente relacionadas à caspase-1. A existência de uma via alternativa à via da caspase-1, mediando a clivagem dessas espécies, foi demonstrada em camundongos e em humanos. Por exemplo, a liberação de IL-1 β pode ser observada em um modelo de inflamação em animais *knockout* para a enzima caspase-1 (Fantuzzi *et al.*, 1997). Proteases extracelulares que podem ser relacionadas para esse papel incluem metaloproteinasas (Schönbeck et al., 1998), granzima A (Irmiler et al., 1995) e proteinase-3 (Fantuzzi, Dinarello, 1999).

A IL-18 aumenta a maturação de células T e NK, produção de citocinas Th1 e citotoxicidade (Nakanishi et al., 2001). Desta forma, apesar de apresentar, juntamente com a IL-12, efeitos consistentes sobre a indução da

via Th1 da inflamação, existem dados que mostram que a IL-18 sozinha, ou em combinação com IL-4 ou IL-2, induz a expressão de IgE e a diferenciação celular em Th2 (Nakanishi et al., 2001). Yoshimoto e col. (2000) demonstraram que essa capacidade da IL-18 induzir ativação da via Th2 da inflamação, na ausência de IL-12, é dependente de IL-4 e STAT-6 (Signal transducer and activation of transcription 6).

O receptor para IL-18, IL-18R, é expresso em uma variedade de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, células NK, endotélio e células musculares lisas (Gracie et al., 2003; Gerdes et al., 2002; Leung et al., 2001). Dados da literatura mostram que a IL-18 ativa a síntese de intermediários reativos de oxigênio e a liberação de citocinas, todas secundárias à ativação de neutrófilos (Leung et al., 2001). Ye e colaboradores (2004) demonstraram que a IL-18 possui papel na cronificação da inflamação em modelo de artrite reumatóide experimental.

A IL-18 *binding protein* (IL-18bp, proteína ligante de IL-18), uma proteína secretada constitutivamente, liga-se à IL-18 com elevada afinidade regulando, dessa maneira, a atividade dessa citocina. Conseqüentemente, a IL-18bp inibe a ativação de IFN- γ , produção de IL-8 e ativação de NF- κ B *in vitro*, bem como inibe IFN- γ *in vivo* secundário à injeção de LPS (Novick et al., 1999). Atividades pró-inflamatória da IL-18 e modulatória da IL-18bp foram discutidas também em modelos que simulam, por exemplo, doença inflamatória intestinal, sepse, artrite, lesão hepática (revisto por Dinarello, Fantuzzi, 2003).

Mais recentemente, um novo membro da família da IL-1 foi descrito, a IL-33. Similarmente à IL-1 β e IL-18, a IL-33 possui marcantes propriedades imunomodulatórias (Schmitz et al., 2005). Contudo, diferentemente da IL-1 β e IL-18, que promovem respostas predominantemente de padrão Th1 (T-helper 1), a IL-33 conduz primariamente a um padrão de ativação Th2, com conseqüente produção de citocinas IL-5 e IL-13 e síntese de imunoglobulinas. Schmitz e colaboradores (2005) sugeriram recentemente que a IL-33 seria o ligante para o receptor órfão ST2, também conhecido como T1, DER4 e Fit-1 (Tominaga, 1989; Werenskiold et al., 1989; Lanahan et al., 1992; Bergers et al., 1994) e IL-1F11, seguindo a nomenclatura da família IL-1 (Sims et al., 2001).

Ainda de forma idêntica às citocinas IL-1 β e IL-18, a IL-33 está presente em uma forma inativa, pró-IL-33, sendo sugerido sua clivagem via caspase-1.

A interação entre a IL-33 e o receptor ST2 é suficiente para ativar NF- κ B e MAPK (p38; ERK1,2; JNK1,2) em mastócitos (**figura 1**). Em adição, a administração de IL-33 em camundongos *naive* promoveu ativação de citocinas de padrão Th2, síntese de IgE e eosinofilia (Schmitz et al., 2005).

O gene codificador de ST2 origina duas isoformas do receptor: uma forma transmembranar, ST2L, e uma forma solúvel, sST2 (Gachter et al., 1996), esta última servindo como um inibidor da ação da IL-33. A forma ST2L é primariamente expressa em células Th2 e, através desse receptor, a IL-33 pode suprimir a resposta inata e adaptativa (Liew et al., 2005). É expressa também em mastócitos, macrófagos e fibroblastos.

Em condições patológicas, a IL-33 pode exercer papel importante como na asma e doença inflamatória intestinal (Dinarello, 2005). É também encontrada nos sinoviócitos em indivíduos com artrite reumatóide e no tecido intestinal de pacientes com doença de Crohn (Carriere et al., 2007).

Apesar das evidências sobre a participação das citocinas da família IL-1 em muitas doenças inflamatórias revelarem um papel indireto, há considerável número de informações para se sugerir que o conhecimento da imunobiologia dessas moléculas seja fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em doenças economicamente importantes, como a mucosite intestinal por antineoplásicos.

1.3.2. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é produto, juntamente com L-citrulina, da conversão da L-arginina e oxigênio molecular mediante ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três isoformas da NOS: NOS-1 (nNOS, neuronal) e NOS-3 (eNOS, endotelial), expressas constitutivamente, produzindo NO em baixos níveis (concentrações picomolares) e a NOS-2 (iNOS, induzida), forma induzida da enzima, expressa geralmente de forma não constitutiva, presente em resposta à citocinas durante o desenvolvimento de um processo inflamatório, levando à produção de NO em concentrações micromolares (Nathan, Xie, 1994).

Todas as isoformas estão presentes no trato gastrointestinal. Na vigência de um estímulo como o LPS, a expressão de iNOS no epitélio intestinal aumenta em até 15 vezes quatro horas após exposição ao produto bacteriano, havendo *up-regulation* dessa isoforma tanto no jejuno como no cólon e íleo (Tepperman et al., 1993; Chen et al., 1996; Hoffman et al., 1997 apud Potoka et al., 2002).

Tem-se relacionado que as citocinas estimulam a expressão de iNOS com a conseqüente produção de óxido nítrico. Um efeito bifásico e dose-dependente da iNOS na inflamação tem sido relatado (Calabrese, 2001). Dependendo da condição, o papel da iNOS varia do aumento do padrão inflamatório à inibição deste (Nathan, 1997). Em baixas concentrações, o NO exerce um efeito protetor contra lesões de mucosa, em parte devido a um efeito vasodilatador que resulta em aumento do fluxo sanguíneo mesentérico (Tepperman *et al.*, 1993; Kubes, MacCafferty, 2000; Cockcroft, 2005). Contudo, em altas concentrações, quando derivado da iNOS, verifica-se um grande papel do NO na citotoxicidade (Han *et al.*, 2003; Potoka *et al.*, 2003), levando ao aumento da permeabilidade do epitélio intestinal (Unno *et al.*, 1997).

Cetin e colaboradores (2007) relataram um efeito negativo dose-dependente do NO sobre as taxas de migração de enterócitos, contribuindo para o aumento da lesão da barreira intestinal observada em modelo da doença inflamatória enterocolite necrosante. Muitos estudos relatam que o NO, oriundo da atividade de iNOS, exibe propriedades deletérias, participando na fisiopatologia de doenças como, por exemplo, a cistite hemorrágica (Souza-Filho *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2002), pancreatite (Gómes-Cambronero *et al.*, 2000) e mucosite oral (Leitão *et al.*, 2007), dentre outros.

1.3.3. PAF e 5-LOX

O dano à superfície epitelial protetora do trato gastrointestinal leva à ativação da fosfolipase A₂ (PLA₂), uma enzima chave na produção e biossíntese de mediadores lipídicos pró-inflamatórios. Os membros da família da PLA₂ induzem a mobilização de ácidos graxos, a partir da membrana celular, para a síntese de mediadores lipídicos para o local de inflamação. Os produtos da ação da PLA₂ incluem fator de ativação de plaquetas (PAF) e

ácido araquidônico. Ao ser enzimaticamente clivado pela 5-lipoxigenase (5-LOX) este último origina leucotrienos e pelas cicloxigenases, origina prostaglandinas e tromboxanos (Sturm, Dignass, 2002).

Os leucotrienos representam, depois das prostaglandinas, a segunda maior família de derivados do ácido araquidônico, possuindo uma potente atividade pró-inflamatória (Sala et al., 1998).

A síntese dos leucotrienos, a partir do substrato ácido araquidônico, é iniciada pela enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) quando há ativação celular durante o processo inflamatório. Nesse contexto, ao ser translocada para a membrana, a 5-LOX se associa à FLAP (proteína ativadora da 5-lipoxigenase), representando um passo necessário à síntese dos leucotrienos (Peters-Golden, Brock, 2003). Uma vez ligado ao receptor acoplado à proteína G, os leucotrienos levam ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio e redução de AMP cíclico. Essa ativação conduz a uma cascata de sinalização, culminando em efeitos como aumento da motilidade intestinal.

Os leucotrienos possuem uma grande variedade de ações biológicas descritas, como, por exemplo, aumento do recrutamento de neutrófilos, produção de citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, aumento da permeabilidade vascular e expressão de moléculas de adesão, sugerindo-se possível participação em diversos estados patológicos como asma, artrite, cistite intersticial, doença inflamatória intestinal e sepse (revisado por Peter-Golden, Henderson, 2007). Shahbazian e colaboradores (2002) demonstraram que o tomelukast, um antagonista do receptor de leucotrieno D₄ (LTD₄) previne as alterações motoras peristálticas causadas pelo LTD₄.

O PAF (fator de ativação de plaquetas) é um mediador fosfolipídico sintetizado e secretado, por exemplo, por mastócitos, monócitos e macrófagos (Finkelman *et al.*, 2005). Níveis circulantes de PAF são, em parte, controlados pela atividade da PAF acetilhidrolase, uma enzima que degrada PAF (Stafforini et al., 1987; Karasawa, 2006). Uma variedade de estímulos leva à síntese de PAF em diferentes células inflamatórias, como em neutrófilos e mastócitos. Uma das vias que levam à biosíntese de PAF envolve estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são constantemente produzidas em células aeróbicas como uma consequência da respiração mitocondrial e como produtos de reações enzimáticas, como

monooxigenase e NADH/NADPH oxidase (Sakamoto *et al.*, 2002). Uma vez sintetizado pelas células efectoras, o PAF é então liberado no meio extracelular ou permanece associado à célula.

A habilidade do PAF, uma vez liberado, de ativar outras células, depende da sua ação sobre o receptor para PAF (PAFr) na superfície dos alvos celulares (Raggers *et al.*, 2001).

O papel do PAF tem sido estudado no contexto da apoptose em modelos de hepatotoxicidade por etanol e LPS. Este modelo é caracterizado por apoptose dos hepatócitos, necrose e extenso infiltrado inflamatório, além do aumento da expressão de receptores Fas-ligante. O pré-tratamento da ratos com antagonista de PAFr (TCV-309) protegeu contra a lesão hepática, apoptose, necrose, infiltrado neutrofilico e expressão do receptor Fas-ligante (Murohisa *et al.*, 2002).

O PAF tem uma diversidade de efeitos biológicos, incluindo ativação de células inflamatórias leucocitárias (Prescott *et al.*, 2000), além de efeitos vasculares. Está também envolvido em condições patológicas inflamatórias como angiogênese nos cânceres de mama (Montrucchio *et al.*, 1998), choque, sepse e lesões traumáticas nos quais o processo inflamatório está exacerbado (revisto por Esmon, 2001).

A liberação de mediadores pró-inflamatórios e vasoativos, como os leucotrienos e PAF, está envolvida no mecanismo fisiopatológico da lesão de mucosas (Öhd *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2007). Em modelos de inflamação intestinal em ratos, antagonistas específicos de receptores para leucotrienos e PAF mostraram-se eficazes em reverter lesões ulcerativas, além de reduzirem a migração de neutrófilos em monocamadas epiteliais colônicas derivadas de humanos em estudo *in vitro* (revisto por Sturm, Dignass, 2000). Dados da literatura questionam a importância primária desses mediadores na gênese primária das lesões de mucosa e ulcerações, uma vez que o tratamento com agentes que seletivamente antagonizam seus receptores nas células alvo, nem sempre interrompem a cadeia de eventos que leva à lesão de mucosa ([Herbert *et al.*, 1991; Vane 1994] apud Sturm, Dignass, 2000). Contudo, é relevante averiguar a importância que esses mediadores assumem em outros modelos inflamatórios intestinais.

1.4. Camptotecinas: Descrição e história natural da camptoteca

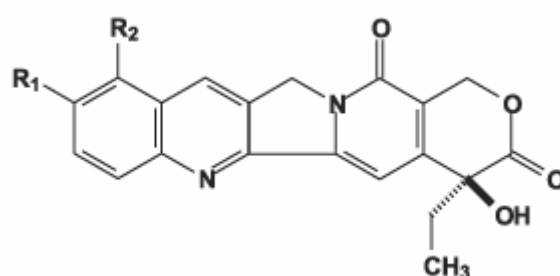
Camptotheca acuminata (**Figura 2**) é uma espécie membro da família Nyssaceae. É uma planta nativa da China e Tibet, onde é conhecida como *xí shu* (árvore feliz). Em 1966, Wall e colaboradores (apud Viegas-Júnior et al., 2006) relataram, pela primeira vez, o isolamento da camptotecina (**figura 3**) a partir da casca do caule dessa árvore. Este composto consiste de um alcalóide tipo quinolina, que por sua vez tem sido modificado para dar origem a muitos compostos com atividade antineoplásica, incluindo o topotecano (**figura 3**), irinotecano (**figura 4**) e 9-aminocamptotecina. Na medicina chinesa, a camptotecina tem sido utilizada para o tratamento da leucemia e carcinomas de estômago e fígado (Duke, Ayensu, 1985).



Figura 2 – *Camptotheca acuminata*. Figura representativa da planta *Camptotheca acuminata*, espécie da qual se extraem camptotecinas naturais

Quase 20 anos depois de sua descoberta, o único mecanismo de ação identificado para a camptotecina foi a inibição da topoisomerase I no DNA. Apesar disso, esta substância não se mostrou adequada para desenvolvimento farmacêutico, principalmente por sua reduzida solubilidade. Estudos mais recentes envolvendo a triagem clínica de seu sal sódico não foram bem sucedidos, pois se evidenciou que a abertura do anel lactônico para

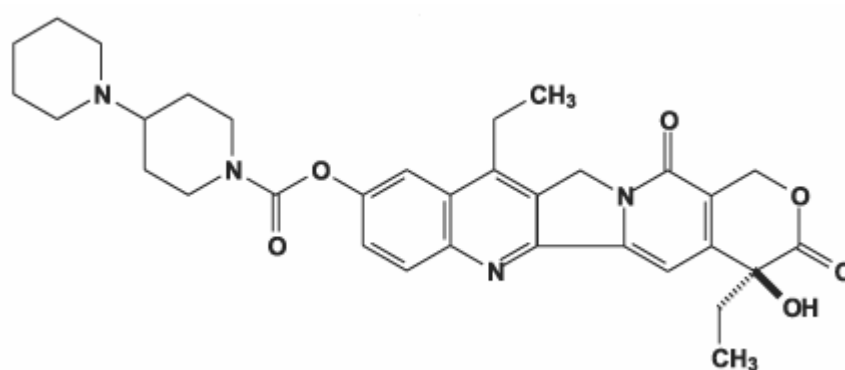
preparação do sal sódico inativa a substância. Esta descoberta abriu caminho para a primeira geração de fármacos análogos da camptotecina, como o irinotecano (CPT-11, Camptosar[®]) e o topotecano (Hycantina[®]), ambos solúveis em água, na forma de sais, preparados preservando-se a subunidade farmacofórica iridoídica, representada pelo anel lactônico hidroxilado (Montanari, Bolzani, 2001; Oberlies, Krall, 2004). Estas duas substâncias foram aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, em 1996, e atualmente são comercializadas, respectivamente, para tratamento de câncer de cólon e de ovário.



Camptotecina: R₁,R₂=H

Topotecano: R₁=OH; R₂= CH₂N(CH₃)₂

Figura 3 – Estrutura da Camptotecina e do Topotecano



Irinotecano

Figura 4 – Estrutura do Irinotecano

1.5. Irinotecano

O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina. Seu nome químico é cloridrato triidrato (4S)-4,11-dietil-4-hidroxi-9-[(4-dipiperidino) carboniloxila]-1H pirano [3',4',6,7] indolizino [1,2-b] quinolina-3,14(4H,12H)diona; sua fórmula molecular é $C_{33}H_{38}N_4O_6 \cdot HCl \cdot 3H_2O$, um composto moderadamente solúvel em água e solventes orgânicos.

A topoisomerase I é uma enzima que atua sobre a dupla fita de DNA relaxando a supertorção gerada durante a fase de transcrição e replicação do DNA (Wang, 1996) Devido ao tamanho do cromossomo eucariótico, a remoção da supertorção se faz necessária e é realizada através da introdução de quebras transitórias em uma das cadeias da dupla fita de DNA, o que permite que a cadeia que foi quebrada gire em torno da fita complementar intacta e a supertorção conseqüentemente seja removida. Após o relaxamento, a ligação intermediária covalente entre a topoisomerase I e o DNA se desfaz, sendo a taxa de religação da fita clivada normalmente mais rápida que a taxa de clivagem (Champoux, 2001). Contudo, uma variedade de drogas tem capacidade, tanto *in vivo* como *in vitro*, de estabilização do intermediário covalente topoisomerase I-DNA, como, por exemplo, o topotecano e o irinotecano. A topoisomerase I é, portanto, o alvo molecular da ação desses agentes, sendo os efeitos citotóxicos, conseqüentemente, fase S específicos.

O irinotecano, um inibidor da topoisomerase I, é uma droga antineoplásica ativa contra uma variedade de tumores, sendo utilizado principalmente no tratamento do câncer coloretal (Chester *et al.*, 2003; Langer, 2004; Perez *et al.*, 2004; Rocha-Lima *et al.*, 2004). É um precursor hidrossolúvel do metabólito lipofílico SN-38 (**figura 5**). Os estudos bioquímicos e análises de citotoxicidade realizados *in vitro* em células tumorais humanas e de roedores indicam, de forma consistente, que o SN-38 é, pelo menos, 1000 vezes mais potente como um inibidor de topoisomerase I do que o irinotecano (Takimoto, Arbuck, apud Koizumi *et al.*, 2006), sendo este último, por conseqüência, comumente descrito como sendo uma pró-droga.

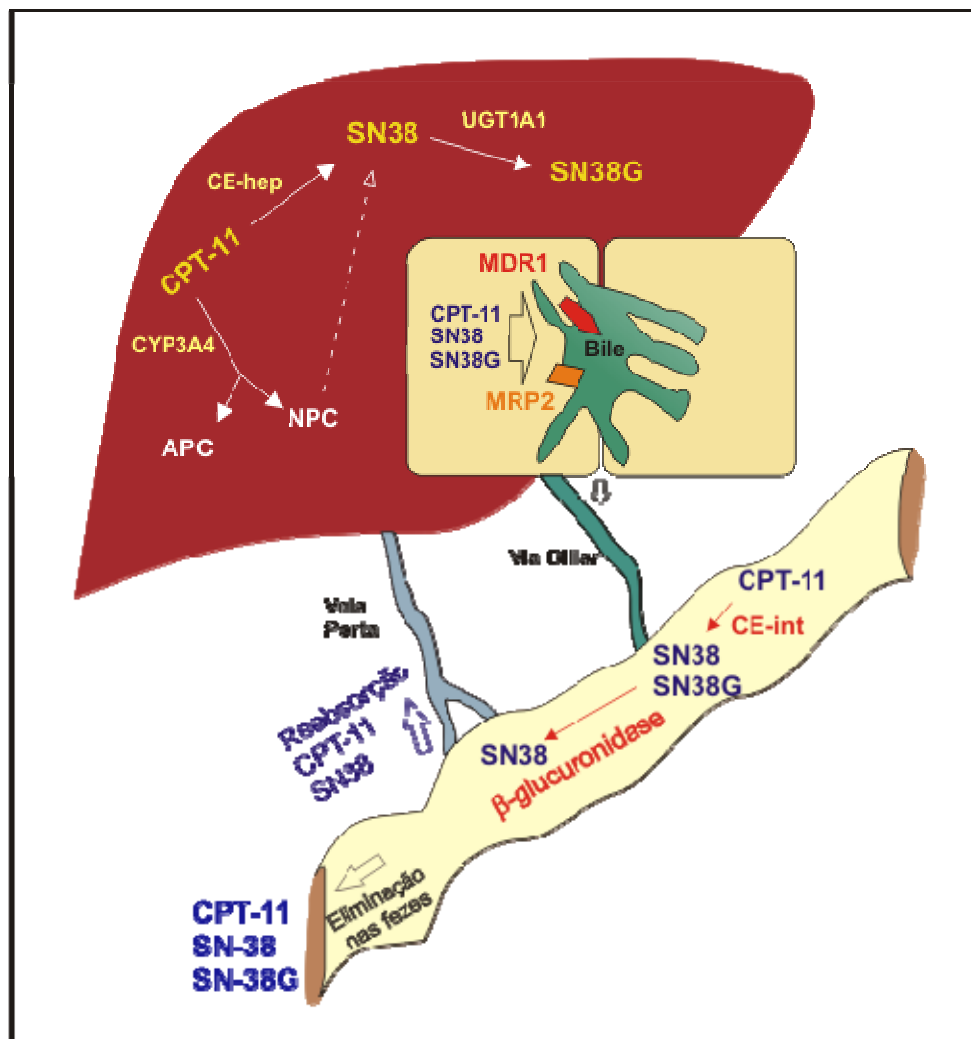


FIGURA 5 – Metabolismo do CPT-11

No fígado, a enzima CYP3A4 atua sobre o CPT-11 gerando dois compostos inativos, APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela CE em SN-38. A depuração do SN-38 é feita no fígado pelo polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase 1 (UGT1A1), gerando glicuronídeos de SN-38 (SN-38G), que são desprovidos de atividade biológica. CPT-11, SN-38 e SN-38G são excretados na bile através das proteínas de transporte MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) e MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) e chegam ao intestino delgado. No intestino delgado, o CPT-11 pode ser clivado pela CE intestinal, formando mais SN-38. Além disso, o SN-38G pode ser desconjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de β -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido iniciando um processo de recirculação êntero-hepática (TREINEN-MOSLEN *et al.*, 2006; HAAZ *et al.*, 1998; CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSEN *et al.*, 2004; DODDS *et al.*, 1998; KHERER *et al.*, 2000; PIZZOLATO *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 1994; CHU *et al.*, 1997; IYER *et al.*, 2002) Extraído de Freitas HC, 2007.

O SN-38 é formado a partir do irinotecano, por clivagem da ligação de carbamato entre a fração camptotecina e a cadeia lateral dipiperidina (**figura 6**) mediada por uma carboxilesterase (Guichard *et al.*, 1999).

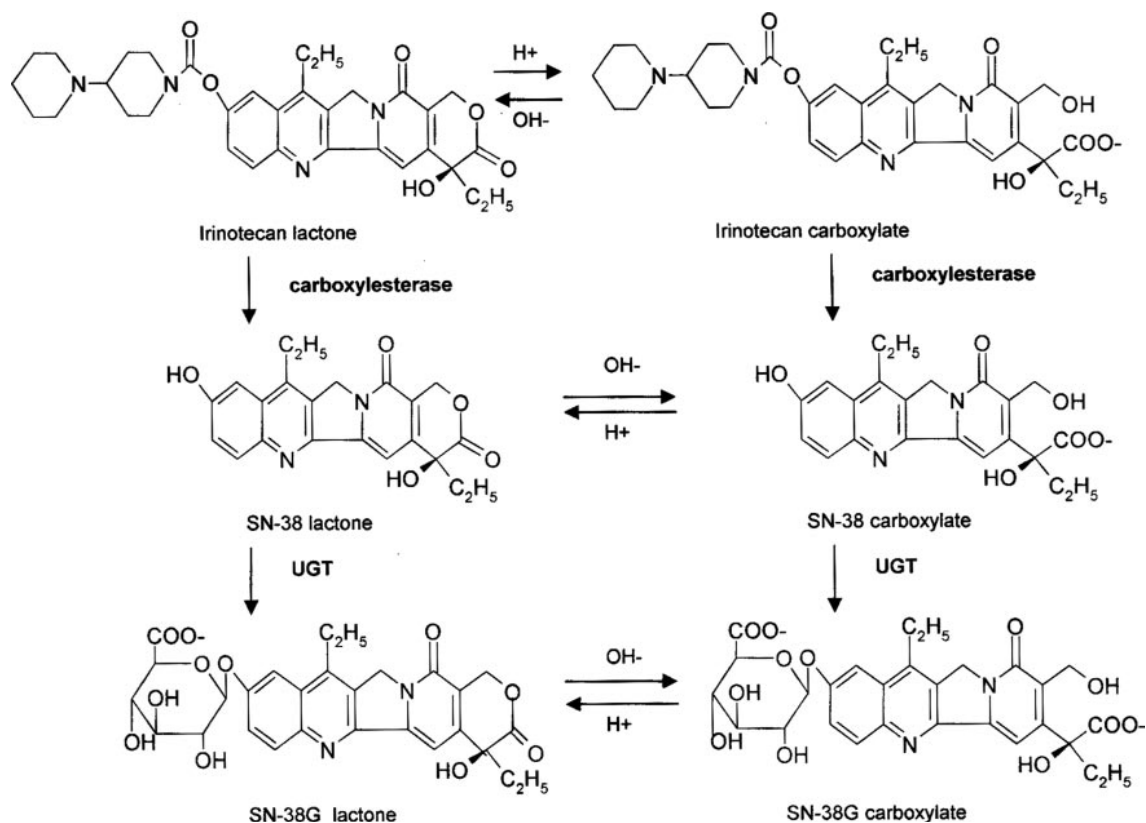


Figura 6 – Detalhes estruturais de produtos do metabolismo do irinotecano.

Glicuronização do composto SN-38 precedida da clivagem do irinotecano pela carboxil esterase. O esquema descreve as formas lactona e carboxilato de cada composto. (Tallman *et al.*, 2005).

Os principais efeitos colaterais relacionados ao tratamento com CPT-11 são neutropenia, mucosite e diarreia, que freqüentemente ocorrem simultaneamente. A diarreia constitui um evento inicial, até 24h após o tratamento com o antineoplásico Irinotecano, estando relacionada com uma estimulação colinérgica, o que permite o manejo profilático com atropina, e um evento tardio, que aparece entre o segundo e o vigésimo primeiro dia após o início do tratamento, mas principalmente entre o sexto e o décimo dia após a administração da droga. O mecanismo preciso de como o irinotecano induz

mucosite intestinal e, conseqüentemente, diarréia é ainda desconhecido. Estudos anteriores investigaram a fase tardia da diarréia induzida por irinotecano e têm sugerido mecanismos diversos como citotoxicidade direta (Ikuno *et al.*, 1995) ou interferência direta com a microbiota intestinal através do aumento da atividade da enzima β -glicuronidase (Takasuna *et al.*, 1996). Mais recentemente, nosso grupo destacou o papel das citocinas TNF- α , IL-1 β e KC no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano (Melo *et al.*, 2008).

1.6. Mucosite: epidemiologia e fases de desenvolvimento

Mucosite é um termo clínico que descreve uma síndrome caracterizada por ulceração da mucosa de todo o trato digestivo, resultando em dor, disfagia, diarréia e disfunção (**figura 7**), dependendo do tecido afetado (SONIS & FAY, 2002; SONIS *et al.*, 2004; SCULLY & SONIS, 2006). Consiste em um efeito adverso comum nos pacientes portadores de câncer submetidos a tratamentos com agentes quimioterápicos diversos, em especial os antimetabólitos e/ou, radioterapia na região de cabeça e pescoço (CABALLERO *et al.*, 1985; BALIS *et al.*, 1985; ROTH *et al.*, 1991; BISHOP *et al.*, 1986; SCULLY *et al.*, 2003; 2004; 2006). Deve-se aos efeitos não específicos das drogas antineoplásicas, lesando as células em processo de divisão celular ativo sejam elas, malignas ou normais. A mucosite intestinal induzida por antineoplásicos é um efeito colateral de grande relevância tendo em vista os custos envolvidos no tratamento, geralmente paliativo, dessa condição.

Clinicamente, a diarréia é o sintoma mais marcante, podendo ser aquosa e em pequeno volume uma ou duas vezes ao dia ou, nos casos mais severos, em número superior a dez episódios por dia. Nos quadros mais dramáticos, pode haver necessidade de nutrição parenteral ou até de intervenções cirúrgicas em casos de perfuração intestinal ou hemorragia maciça (GIBSON *et al.*, 2002; BLIJLEVENS *et al.*, 2007). A **Figura 7** ilustra uma representação esquemática dos sintomas e complicações decorrentes da mucosite intestinal.

A **Tabela 1** descreve os critérios de graduação da diarréia formulados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*NCI –National Cancer*

Institute), usados universalmente em estudos clínicos e também na prática clínica assistencial.

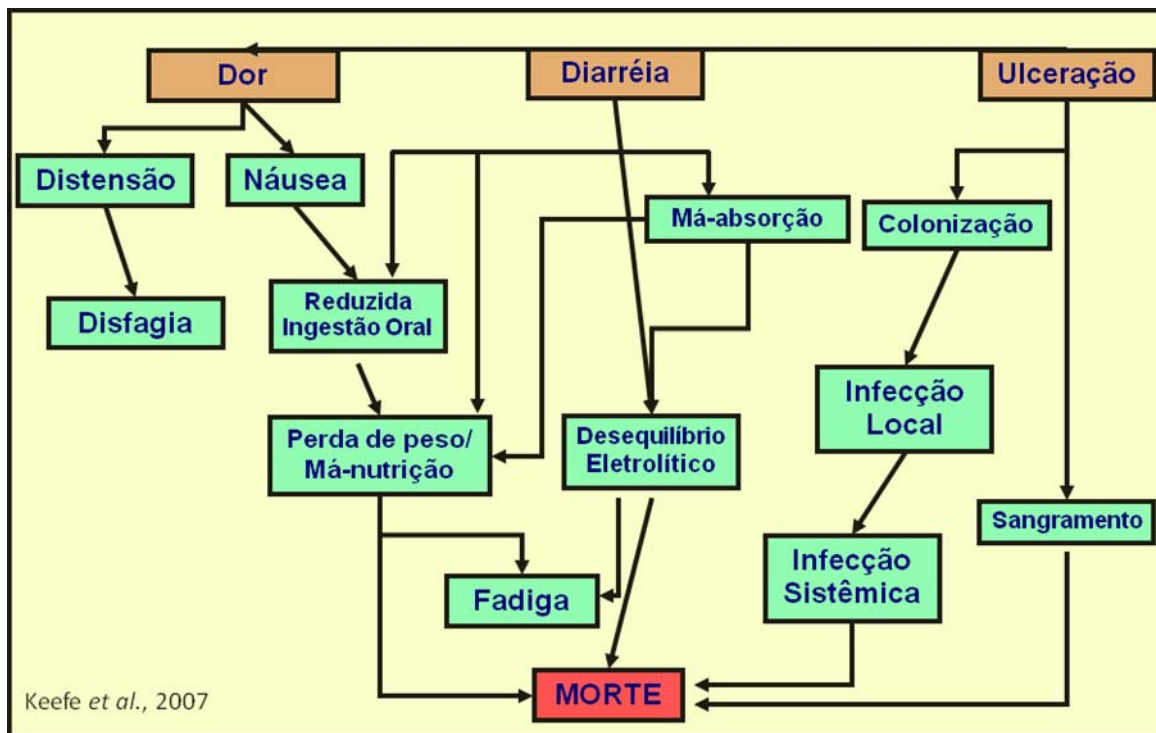


FIGURA 7 – Representação esquemática de sintomas e alterações clínicas da mucosite gastrointestinal

Os pacientes com mucosite intestinal podem apresentar sintomas leves e auto-limitados. Entretanto, esse é um efeito adverso potencialmente capaz de gerar numerosas complicações, incluindo quadros graves e irreversíveis (KEEFE *et al.*, 2007 adaptado por Freitas, 2007).

Um dos problemas em se entender a mucosite e a diarreia a ela associada recai no fato de que os mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa doença não são conhecidos com precisão. Realizar uma terapia efetiva dessa condição continua sendo um desafio na prática clínica. A diarreia é observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando diarreia de grau 3-4 (**tabela 1**) pode ser observada em até 25% dos pacientes (Cunningham *et al.*, 1998; Keefe *et al.*, 2007). Tem sido descrita uma incidência de mucosite em aproximadamente 40% dos pacientes em uso de vários agentes quimioterápicos (CABALLERO *et al.*, 1985; BALIS *et al.*, 1985; ROTH *et al.*,

1991; BISHOP *et al*, 1986; SCULLY *et al.*, 2003; 2004; 2006). A combinação de diferentes drogas antineoplásicas aumenta essa incidência de 40 para 70% (CABALLERO *et al*, 1985; BALIS *et al*, 1985; ROTH *et a.*, 1991; SCULLY *et al.*, 2006). Nos tratamentos prévios com quimioterápicos ou radioterapia para transplante de células hematopoiéticas, a ocorrência de mucosite atinge até 75 a 99%, dos pacientes, particularmente nos casos em que se associa irradiação e quimioterapia (DONNELLY *et al.*, 1992; BLIJLEVENS *et al.*, 2000).

TABELA 1– Critérios comuns de terminologia para eventos adversos (versão 3.0) - Diarréia

Grau 1	Aumento da frequência das evacuações, menor que 4 vezes por dia
Grau 2	Aumento da frequência das evacuações de 4 a 6 vezes por dia Necessidade de hidratação venosa <24h Sem interferência nas atividades diárias
Grau 3	Aumento da frequência das evacuações ≥ 7 vezes por dia Necessidade de hidratação venosa ≥ 24 h ou hospitalização Interferência nas atividades diárias
Grau 4	Risco à vida (ex. colapso hemodinâmico)
Grau 5	Morte

Fonte: National Cancer Institute

A importância clínica se torna evidente se considerarmos que a diarréia pode, muitas vezes, requerer alterações no esquema de tratamento antineoplásico adotado ou, até mesmo, comprometer a viabilização do tratamento. A diarréia é geralmente controlada com loperamida, porém nos casos mais graves do evento adverso (graus 3 e 4) o tratamento se mostra ineficaz. Outras estratégias têm sido sugeridas, tal como octreotida, acetorfan, antibióticos, glutamina, budesonida, IL-15, talidomida, inibidores da enzima cicloxigenase-2, ciclosporina e alcalinização do lúmen intestinal (Gibson and Keefe, 2006). Recentemente, novas drogas tem sido incorporadas à prática clínica, como as pequenas moléculas inibidoras de tirosina quinase, por

exemplo, imatinibe, sorafenib e lapatinibe. Apesar de estas fazerem parte do grupo de drogas alvo direcionadas (*targeted therapy*), com um mecanismo de ação bastante pontual, elas não estão livres de apresentar efeitos colaterais. Mesmo que essas drogas representem uma mudança do paradigma em oncologia, é evidente que a incidência de diarreia/mucosite intestinal provavelmente não diminua nos próximos anos.

Postula-se que há mecanismos individuais e fatores tissulares específicos envolvidos no desenvolvimento da mucosite. Fatores individuais incluem sexo, raça e doenças sistêmicas concomitantes, enquanto mecanismos tecido-específicos incluem tipo de epitélio em consideração, sistema endócrino intrínseco, função tecidual e microbiota local (Keefe, 2007). Fatores individuais polimórficos têm sido também relacionados. A uridina 5'-difosfato-glicuronosil-transferase (UGT1A1) é uma enzima responsável pelo metabolismo do irinotecano, que pode determinar a variação da susceptibilidade individual à toxicidade do irinotecano (Ando *et al.*, 2007).

Sonis e colaboradores descreveram a mucosite por antineoplásicos como um processo complexo, no qual ocorre a seguinte seqüência de eventos biológicos interligados: iniciação, resposta primária ao dano, sinalização (e amplificação), ulceração e, finalmente, cicatrização (SONIS *et al.*, 2004; SCULLY *et al.*, 2006). A manifestação de todos os estágios não ocorre obrigatoriamente em todos os casos. Portanto, em uma mucosite branda com poucos danos à mucosa, a rápida recuperação e proliferação epitelial evita a ocorrência da fase ulcerativa, que é a mais sintomática (SONIS, 1998; SONIS & FAY, 2002).

A fase de iniciação ocorre logo após a radiação ou quimioterapia. A lesão celular direta das células epiteliais basais ocorre simultaneamente com a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio (SONIS *et al.*, 2004). A resposta primária ao dano, observada nas células e tecidos da submucosa, é caracterizada pela expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg 1, e pela ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear-κB (NF-κB) (SCULLY *et al.*, 2006). Em paralelo à ativação do NF-κB, enzimas como a esfingomielinase e a ceramida sintetase, que catalizam a síntese de ceramida, são ativadas diretamente pela quimio e/ou radioterapia,

ou indiretamente, pelas espécies reativas de oxigênio e TNF- α . A via da ceramida induz apoptose tanto em células submucosas, como epiteliais (MADDENS et al, 2002). Adicionalmente, a destruição da fibronectina também ocorre nessa fase da mucosite, resultando na ativação de macrófagos e subsequente injúria tecidual, mediada pelas metaloproteinases e produção adicional de TNF- α . A participação do TNF- α na patogênese da mucosite oral foi evidenciada por trabalho do nosso laboratório que mostrou que a pentoxifilina e a talidomida, ambas inibidores da síntese de TNF- α , reduzem significativamente a lesão gastrointestinal induzida por 5-FU em hamster (LIMA et al., 2005).

Em resumo, a liberação de mediadores inflamatórios, em resposta à quimio ou radioterapia, resulta em uma série de retroalimentações positivas, amplificando e prolongando a injúria tecidual, através de seus efeitos nos fatores de transcrição e nas vias da ceramida e caspases, resultando em apoptose e liberação de mais mediadores inflamatórios como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6.

A fase seguinte, denominada ulcerativa é a mais sintomática e usualmente ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente. A lesão e morte das células basais epiteliais resultam em mudanças atróficas que culminam na real deterioração e quebra da mucosa. Nessa fase é comum a ocorrência de infecção secundária, visto que a úlcera serve de foco para a colonização de microorganismos. Os produtos da parede celular de bactérias penetram na submucosa estimulando a liberação de mais citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em inflamação, dor, possíveis infecções secundárias ou influxo sistêmico de microorganismos e toxinas que, associado à neutropenia induzida pelas drogas antineoplásicas, aumenta o risco de bacteremia e septicemia (ELTING et al. 1992, SONIS et al., 2004).

A fase de cicatrização é biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, estimulando a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. Além disso, observam-se o retorno da flora microbiana normal e a recuperação do número de leucócitos (SONIS et al., 2004). Nosso grupo demonstrou que a glutamina e seu derivado estável alanil-glutamina

aceleram a recuperação da mucosa oral lesada pelo uso de 5-FU (LEITÃO et al., 2007b).

1.7. Mucosite intestinal por antineoplásicos

Um fator limitante no estudo da mucosite intestinal na prática clínica reside na dificuldade de se acessar a própria lesão, visto que se utilizam meios invasivos como endoscopia digestiva com biópsia.

Por serem os agentes citotóxicos mais efetivos em tecidos com alta taxa proliferativa, o epitélio do trato gastrintestinal, pela sua elevada taxa de renovação celular, torna-se particularmente susceptível aos efeitos danosos dos antineoplásicos (PARRILLI *et al*, 1989; PLEDGER *et al*, 1988). Esses danos parecem envolver principalmente as células das criptas intestinais (SKUBITZ, 1994; SHOU *et al*, 1991; FOX *et al*, 1988).

Um aspecto importante da mucosite induzida por antineoplásicos consiste no fenômeno da translocação bacteriana através de um epitélio funcionalmente e estruturalmente danificado, evento que parece desempenhar papel relevante na toxicidade intestinal da quimioterapia e da radioterapia (FOX *et al*, 1988; ALVERDY, 1990; SOUBA *et al*, 1990). A destruição celular gastrintestinal observada na mucosite por uso de antineoplásicos é resultado de hipoproliferação celular (TRIER, 1962; ALTMAN, 1974), com atrofia das vilosidades e aprofundamento das criptas que resulta de disfunção absorptiva, alteração na secreção de eletrólitos, principalmente Na⁺ e K⁺, que pode acarretar diarreia (DONALDSON & LENON, 1979; KEEFE *et al*., 1997; CARNEIRO-FILHO *et al*., 2004a).

Nosso grupo demonstrou (CARNEIRO-FILHO *et al*, 2004a) que ratos tratados com o agente antineoplásico metotrexato apresentavam perda de peso associado a uma diminuição da absorção e da atividade enzimática do epitélio, além da destruição da mucosa do duodeno, jejuno e íleo, com presença de infiltrado celular, reforçando a hipótese da fase inflamatória da mucosite. Ademais, foi demonstrada uma redução da excreção de manitol quando os ratos foram tratados com metotrexato, mostrando que a permeabilidade do intestino estava alterada. Essas alterações da

permeabilidade intestinal a vários açúcares, sugerem que os efeitos deletérios sistêmicos, como desnutrição e desidratação, advêm principalmente dos danos causados à capacidade absorptiva da mucosa intestinal (KEEFE *et al*, 1997).

Outro estudo de nosso laboratório demonstrou que o tratamento de camundongos com CPT-11 também causa uma mucosite intestinal significativa, apresentando dano na mucosa, com pequenas áreas desnudas. Além disso, houve achatamento dos vilos, vacuolização do epitélio intestinal, necrose das criptas e intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria (MELO, *et al.*, 2007). Essa combinação da lesão da mucosa com o infiltrado neutrofílico reforça a hipótese de ocorrência de uma fase inflamatória no processo patológico da mucosite induzida por tratamento com CPT-11 (Sonis 2004).

Assim, a mucosite intestinal resulta de eventos inflamatórios, que levam às alterações de permeabilidade, trânsito intestinal e na motilidade intestinal. Porém faltam estudos sobre os mediadores inflamatórios envolvidos.

1.8. JUSTIFICATIVA

Ao longo das últimas cinco décadas, o número de agentes antineoplásicos tem crescido exponencialmente e contribuído para o aumento da qualidade de vida e da sobrevivência de pacientes com inúmeros tipos de câncer (KENNEDY, 1991). Entretanto, os pacientes passaram a sofrer com efeitos adversos limitantes como náuseas e vômitos, neutropenia, infecções, mucosite oral e intestinal. Muito tem se descoberto, em parte com nossa colaboração, com relação aos mecanismos e mediadores envolvidos nos efeitos colaterais da quimioterapia do câncer. Nesse contexto, observamos que o tratamento com irinotecano (CPT11) em camundongos causou uma significativa diarreia nos animais, com diminuição dos vilos intestinais e perda da arquitetura das criptas. Observamos ainda um aumento na concentração intestinal de TNF- α , IL-1 β e KC. Um fato interessante foi que semelhante à mucosite oral induzida por 5-FU, o irinotecano (CPT-11) induziu um aumento da infiltração de neutrófilos para a mucosa intestinal a despeito de ter promovido leucopenia (MELO, et al., 2007), evidenciando que a mucosite intestinal induzida por irinotecano e a mucosite oral por 5-FU são processos inflamatórios que cursam com uma importante infiltração de neutrófilos.

As citocinas e a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio parecem de fato assumir um papel importante nas vias de desenvolvimento da mucosite induzida por quimioterápicos. Contudo, o conhecimento aprofundado acerca das intrincadas vias inflamatórias que culminam nas lesões de mucosa observadas na mucosite ainda requer maiores estudos, podendo as mesmas se tornarem alvos terapêuticos importantes.

Atualmente, o tratamento padrão para mucosite induzida por antineoplásicos é essencialmente paliativo, com suportes analgésico e nutricional. Alguns agentes têm sido introduzidos na prática clínica para tratamento da mucosite induzida por quimioterápicos, a exemplo da palifermina (recombinant keratinocyte growth factor). Contudo, sua utilização é restrita para prevenção de mucosite em pacientes tratados com quimio e radioterapia anteriores à realização de transplante de medula óssea. Um outro inconveniente envolve o alto custo para o tratamento, não se justificando sua utilização quando o risco de desenvolvimento de mucosite é baixo (revisto por

von Bültzingslöwen et al., 2006). A interleucina-11 também foi avaliada em estudos clínicos envolvendo mucosite oral secundária à quimio e radioterapia em pacientes transplantados com células-tronco. Porém, nenhum progresso significativo foi encontrado (Antin et al., 2002).

O interesse especial nos aspectos iniciais da mucosite intestinal implica numa eventual possibilidade de modulação farmacológica do processo. Como ainda não se dispõe hoje de meios efetivos para amenizar os efeitos da mucosite na maioria dos casos (RUBENSTEIN *et al.*, 2002), os pacientes ainda sofrem com sintomas desconfortáveis, com o maior risco de sepse e com a possível redução da eficácia do tratamento oncológico devido a atrasos e reduções de doses (PICO *et al.*, 1998; GIBSON *et al.*, 2002; BLIJLEVENS *et al.*, 2007; KEEFE *et al.*, 2007 revisto por Freitas HC, 2007).

Desta forma, justifica-se o desenvolvimento de um conhecimento aprofundado da fisiopatologia dessa alteração inflamatória como forma de se buscar meios preventivos e terapêuticos que permitam uma melhoria significativa da qualidade de vida dos pacientes acometidos, evitando a redução das doses dos quimioterápicos e a interrupção temporária ou definitiva do tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Estabelecer a fisiopatologia das alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais (diarréia e contratilidade) observadas na mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11).

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos C57BL/6 avaliando-se parâmetros histopatológicos (através de escores microscópicos) e funcionais (contratilidade *in vitro* e análise de diarréia);
- Estudar os mecanismos e mediadores envolvidos na mucosite intestinal induzida por CPT-11 no modelo padronizado, verificando a participação da protease caspase-1, das citocinas interleucina-1 (IL-1), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-33 (IL-33), do óxido nítrico, e de mediadores lipídicos 5-lipoxigenase e PAF assim como a seqüência de interação entre esses mediadores sob aspectos morfofuncionais e inflamatórios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Padronização da mucosite intestinal

Os animais C57BL/6 ou Swiss receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de Irinotecano (CPT-11, Camptosar[®], Pfizer), nas doses de 45, 60 e 75 mg/kg, ou salina (5 mL/kg), uma injeção por dia de acordo com protocolo desenvolvido por Ikuno et al. (1995). Para a avaliação morfofuncional, os animais foram sacrificados no dia 5 após a primeira injeção de CPT-11 (Figura 8).

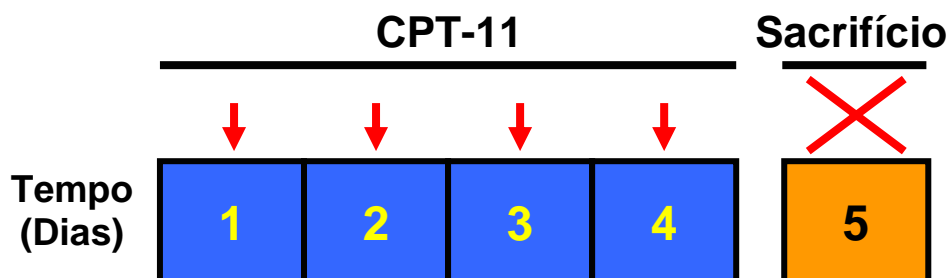


FIGURA 8 – Esquema de injeção do CPT-11

3.2. Avaliação da participação de caspase 1, IL-18, IL-1, IL-33, iNOS, 5-LOX e PAFr na mucosite intestinal induzida por CPT-11 em camundongos

Animais:

Foram utilizados camundongos C57BL/6, BALB/c, 129Svev e *knockout* para caspase-1 (caspase-1^{-/-}), citocina IL-18 (IL-18^{-/-}), óxido nítrico sintase induzida (iNOS^{-/-}), 5-Lipoxigenase (5-LOX^{-/-}), receptor para PAF (PAF^{-/-}) machos, pesando entre 20 e 25 g. Os animais foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de 22 ± 2°C num ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão. Os animais foram originalmente obtidos pelo Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA), criados e

fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Os protocolos desenvolvidos estavam de acordo com os padrões de uso de animais experimentais, sendo o projeto previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC (protocolo 02/04).

Drogas:

Cloridrato de Irinotecano (CPT-11, Camptosar[®], ampolas 5mL, 100mg/mL, Pharmacia & Upjohn Co. Kalamazoo, EUA).

As soluções utilizadas consistem em soro fisiológico 0,9%, IL-1Ra recombinante (antagonista do receptor da IL-1, NIBSC 92/644), IL-18bp (proteína ligante da IL-18), IL-33 (interleucina-33), aminoguanidina e cloridrato de loperamida (antidiarréico adotado como padrão) diluídas em SF 0,9%,

Protocolos desenvolvidos:

I - Camundongos C57BL/6 (WT, tipo selvagem) e animais Caspase-1 *knockout* (Caspase-1^{-/-}) foram tratados com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.) ou CPT-11 (60 mg/kg) por via intraperitoneal, por quatro dias uma vez ao dia.

II - Camundongos BALB/c foram divididos em grupos (n=4-5). **Grupo I:** controle normal tratado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo II:** animais tratados com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.); **Grupo III:** animais tratados com IL-1Ra (50 mg/kg, s.c., um antagonista do receptor de IL-1); **Grupo IV:** animais tratados com IL-1Ra administrado diariamente 1h antes do antineoplásico CPT-11.

III - Camundongos BALB/c (WT, tipo selvagem) e animais IL-18 *knockout* (IL-18^{-/-}) foram tratados com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg) ou CPT-11 (60 mg/kg) por via intraperitoneal, por quatro dias uma vez ao dia.

IV - Camundongos BALB/c foram divididos em grupos (n=4-5). **Grupo I:** controle normal tratado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo II:** animais tratados com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.); **Grupo III:** animais tratados com IL-18bp

(200 µg/animal, i.p., uma proteína ligante de IL-18) administrada diariamente 1h antes do antineoplásico CPT-11.

V - Camundongos BALB/c foram divididos em grupos (n=4-5). **Grupo I:** controle normal tratado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo II:** animais tratados com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.); **Grupo III:** animais tratados com IL-33 (1 µg/animal, e.v.); **Grupo IV:** animais tratados com IL-33 administrado diariamente 1h antes do antineoplásico CPT-11.

VI - Os camundongos C57BL/6 e *knockout* para iNOS (iNOS^{-/-}) foram tratados com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg) ou CPT-11 (60 mg/kg) por via intraperitoneal, por quatro dias uma vez ao dia.

VII - Animais C57BL/6 foram divididos em grupos (n=4-5). **Grupo I:** controle normal tratado com salina (SF 0,9%, i.p.); **Grupo II:** animais tratados com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.); **Grupo III:** animais tratados com aminoguanidina (AMI, 50 mg/kg, s.c., um inibidor de iNOS); **Grupo IV:** animais tratados com AMI administrada no dia 1º dia 1h antes, 6 e 12h após o antineoplásico e do segundo ao quarto dia de injeção do CPT-11, foram feitas administrações de 12/12h.

VIII - Camundongos 129Svev (WT, tipo selvagem) e animais *knockout* para 5-lipoxigenase, 5-LOX^{-/-}, foram tratados com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg) ou CPT-11, por via intraperitoneal, por quatro dias uma vez ao dia.

IX - Camundongos BALB/c (WT, tipo selvagem) e animais *knockout* para receptor PAF, PAFr^{-/-}, foram tratados com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg) ou CPT-11, por via intraperitoneal, por quatro dias uma vez ao dia.

X - Camundongos BALB/c foram divididos em grupos (n=4-5). **Grupo I:** controle normal tratado com salina (SF 0,9%, 5 mL/kg, i.p.); **Grupo II:** animais tratados com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.); **Grupo III:** animais tratados com cloridrato de loperamida (3 e 30 mg/kg, s.c.); **Grupo IV:** animais tratados com cloridrato de

loperamida (3 mg/kg nos dia 1 e 2 e 30 mg/kg nos dia 3 e 4 de administração do CPT-11) administrado diariamente 1h antes e 12h após Irinotecano.

Em todos os protocolos, no quinto dia após início do tratamento com CPT-11, a diarreia foi avaliada segundo escores pré-estabelecidos. Amostras de sangue foram coletadas e, em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Amostras do duodeno foram retiradas, pesadas e congeladas a -70°C para dosagem de atividade da enzima mieloperoxidase. Outra amostra de tecido foi coletada, imersa em formol a 10% e, após 24 horas, transferida para álcool 70% para análise microscópica. Por fim, realizou-se o estudo de contratilidade *in vitro*.

3.3. Parâmetros avaliados na mucosite intestinal

3.3.1. Avaliação de parâmetro hematológico

Os animais foram levemente anestesiados com éter etílico para coleta de 20 μL de sangue. Esta amostra foi diluída imediatamente em 380 μL de solução de Turk. A contagem total de leucócitos na amostra foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer para verificação do efeito do CPT-11 no que concerne ao efeito sobre o número de leucócitos circulantes (indução de leucopenia). Essa observação serviu como controle da atividade do CPT-11 sobre o animal.

3.3.2. Avaliação do grau da diarreia apresentada

Aos eventos de diarreia, apresentados no quinto dia após o início do tratamento dos animais com CPT-11, foram atribuídos escores (segundo proposta de Kurita et al., 2000), como discutido a seguir: 0=fezes com aspecto normal; 1=fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal (**figura 9**). Esse parâmetro representou um indicativo de indução da mucosite, tendo em vista a associação do sinal diarreia à mucosite, observada na prática clínica.

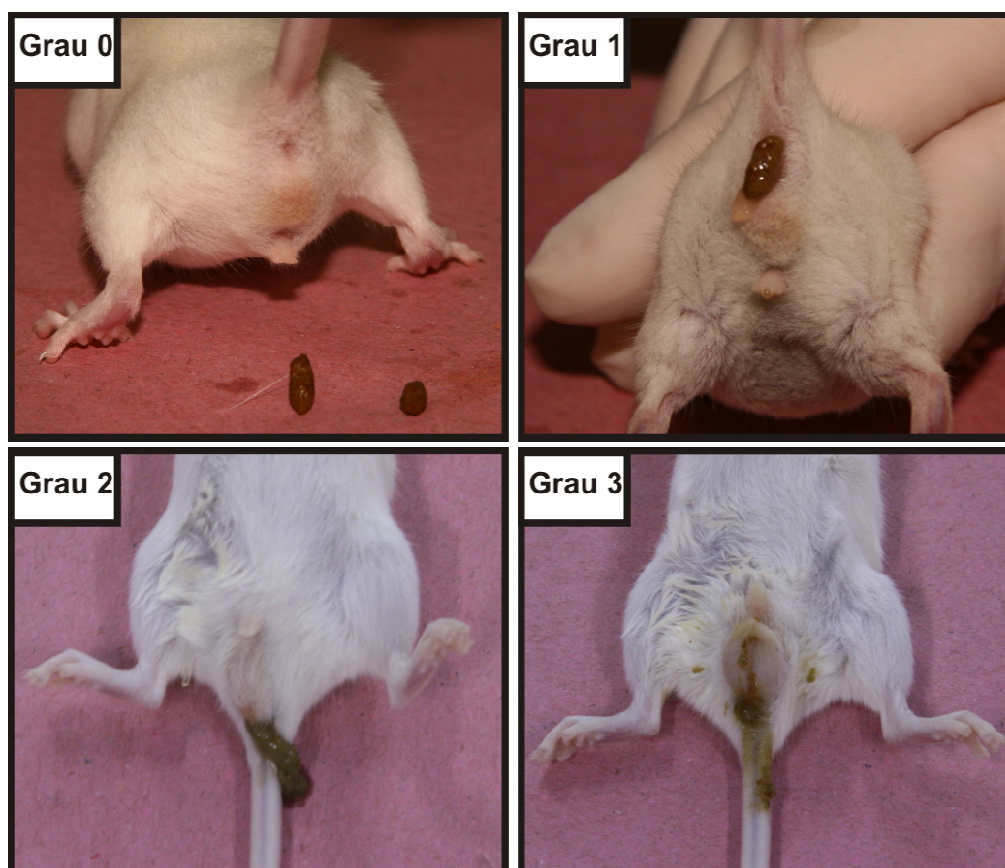


FIGURA 9 - Representação dos graus de diarreia pós-injeção do CPT-11.

À diarreia são atribuídos escores de acordo com a intensidade. Grau 0=fezes com aspecto normal; Grau 1=fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; Grau 2=fezes úmidas com pouca sujidade perianal; Grau 3=fezes úmidas com bastante sujidade perianal

3.3.3. Avaliação da contratilidade de duodeno *in vitro*

Foram realizados os estudos da contratilidade *in vitro* de duodeno, conforme descrito por Araújo e colaboradores (2005), após o 5º dia de início do tratamento dos animais com CPT-11. Após exposição da cavidade peritoneal dos animais, segmentos de duodeno (0,5 cm) foram retirados, cortados no sentido da musculatura circular e colocados em uma placa de Petri, contendo uma solução nutritiva de Tyrode modificada (contendo a seguinte composição expressa em mM: NaCl 136; KCl 5; MgCl₂ 0,98; CaCl₂ 2,0; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 11,9; Glicose 5,5) para limpeza, retirada de tecidos adjacentes e, em

seguida, amarrados com linha no sentido da musculatura longitudinal, suspensos em banho de órgão (20mL de solução de Tyrode, aquecida a 37°C, pH=7,4 e oxigenada continuamente com mistura carbogênica 95% O₂/5% CO₂) e conectados a um transdutor de força (ADInstruments, modelo MLT0201, EUA), apropriado para registro isométrico de contrações, conectado a um Amplificador (ADInstruments, ML845 Powerlab 4/25, EUA), para registro das contrações longitudinais da preparação. Os sinais gerados pelo transdutor foram registrados em um Sistema de Aquisição de Dados (Chart Pro, EUA). Após calibração do sistema, foi aplicado ao tecido 1g de tensão de repouso e o tempo de equilíbrio com as condições artificiais do banho foi de 40 minutos. Duas contrações padrão (fase fásica) foram inicialmente obtidas mediante a adição de KCl 60 mM ao banho e, em seguida, feita uma curva concentração-efeito com o agonista colinérgico acetilcolina (ACh em concentrações crescentes e cumulativas variando de 10⁻¹⁰-10⁻⁴M adicionadas ao banho pelo período máximo de 5min para cada concentração). Entre as aplicações de KCl e entre a de KCl e a primeira de ACh realizou-se a troca de solução (lavagem do preparo) permitindo-se a estabilização do padrão contrátil basal antes da adição de novo agente ao banho (**FIGURA 10**). Os dados obtidos da curva de ACh foram analisados como percentual de resposta contrátil em relação à média das contrações padrão observadas inicialmente para o KCl 60 mM.

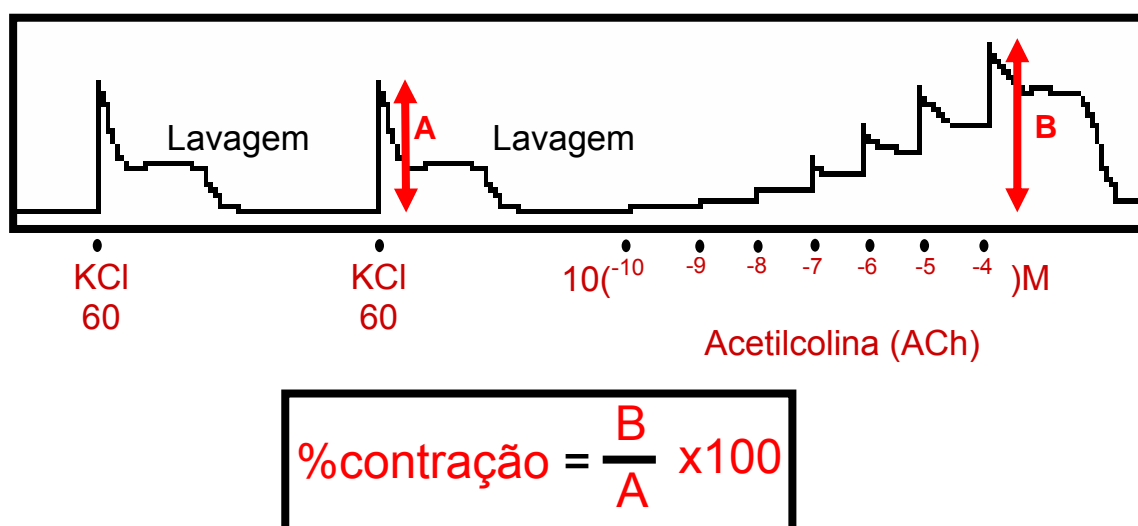


FIGURA 10 – Esquema de avaliação funcional intestinal *in vitro*

3.3.4. Análise histopatológica e Morfometria da mucosa intestinal

Após o sacrifício dos animais, foi removido um segmento de 0,5 cm do duodeno proximal do camundongo. A seguir, essas amostras foram fixadas em formol tamponado 10% e processadas para coloração pelo método HE (hematoxilina-eosina) para exame em microscopia óptica 100x (Microscópio Nikon com objetiva 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x).

A análise histopatológica envolveu a observação do aspecto de vilos e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório. O grau e a severidade da mucosite foi determinado de acordo com o sistema de escores proposto por Woo et al. (2000) e descritos a seguir: 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 com perda da arquitetura das criptas e encurtamento dos vilos.

Para análise morfométrica, objetivou-se obter a medida de vilos, considerada desde o ponto de encontro entre dois vilos até o topo do vilo em questão (altura do vilo), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre dois vilos medidas até a o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade absorptiva (razão altura dos vilos/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento dos vilos intestinais e as criptas de Lieberkühn foi calculada em μm utilizando-se o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilos e criptas por corte histológico.

3.3.5. Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido

inflamado, cuja presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de ELISA. Uma porção do duodeno foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50mg de tecido por mL, e homogeneizada e centrifugada (1500 g/15 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante (placas de 96 wells), 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H₂O) foram adicionados e lidos a 460nm (t₀=0 min e t₁=1 min). A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e expressa como neutrófilos/mg de tecido (atividade de MPO).

3.3.6. Dosagem de citocinas IL-1 e KC

Os animais tiveram amostras do duodeno retirados no 5° dia para análise de citocinas e estocados em freezer -70°C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por Safieh-Garabedian et al. (1995). A detecção de IL-1 e KC foi determinada por ELISA, como descrito previamente (Cunha FQ et al., 1993). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-IL-1 e anti-KC murino (2µg/mL). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado anti-IL-1 e anti-KC diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. O reagente de cor 0-fenilenodiamina (OPD, 50µL) foi adicionado 15min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 15 a 20min. A Reação enzimática foi parada com H₂SO₄ e a absorbância medida a 490nm. O resultado foi expresso em pg/mL/mg proteína.

3.3.7. Determinação da atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS)

As medidas de atividade da NOS, foram realizadas a partir das amostras de duodeno, utilizando método previamente descrito (GOMES et al., 2004). No 5º dia, após a primeira administração de CPT-11, os animais foram sacrificados e porções de duodeno foram coletadas, e mantidas em *freezer* a -70° C até realização do ensaio. As amostras homogeneizadas (Polytron- PT 3100) em 0,3 mL de tampão de extração pH=7 (320 mM sucrose; 50 mM Tris; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10µg/mL leupeptina; 10µg/mL inibidor de tripsina de soja; 2µg/mL aprotinina; 2 mM PMSF) e centrifugados (9.000 g/10min/4°C). A seguir, 40 µL de cada sobrenadante foram incubados com 100 µL do tampão de ensaio pH=7,4 (50 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgCl₂.6H₂O; 0,25 mM CaCl₂; 0,12 mM β-NADPH; 60 mM L-valina; 1 mM L-citrulina; 50µM BH₄; 4µM FAD; 1 mM DTT) por 1 hora. As amostras foram preparadas em triplicata. **Tubo 1**: sem inibidores de NOS; **Tubo 2**: L-NAME (inibidor não-seletivo de NOS) e aminoguanidina (inibidor seletivo de iNOS); **Tubo 3**: EGTA (quelante de cálcio para as isoformas constitutivas). L-arginina-¹⁴C (270 µCi/ mMol) foi adicionada à razão de 5,4 µL para cada 1mL de tampão de ensaio. Como controles do ensaio, quatro grupos foram preparados: **grupo 1**: tubos para avaliar o background (este tubo não continha amostra); **grupo 2**: tubos para quantificar o total de cpm - contagens por minuto (neste tubo não foi adicionado o Dowex nem as amostras); **grupo 3**: tubos com 7x 10⁶ macrófagos ativados com LPS e IFN-γ (controle NOS induzida); **grupo 4**: tubos com homogenato de cerebelo (controle NOS neuronal). Em seguida, 1mL de resina Dowex AG-50X8 sódica (1:1 em água, pH 6,0) foi adicionado aos tubos de ensaio, homogeneizados e centrifugados (9.000 g/10min/4C). Foram colocados 400 µL do sobrenadante destes tubos em 3 mL de líquido de cintilação e, após agitação, a radioatividade foi quantificada por contador beta por 1 minuto para cada tubo. Também foi realizada a quantificação das proteínas totais de cada amostra pelo método de Comassie Blue (Comassie Blue Reagent; Pierce Chemical, Rockford, IL). Os resultados foram expressos como pmol de citrulina/hora/mg de proteína.

3.3.8. Análise estatística

A análise estatística, realizada com o software GraphPad Prism[®], versão 3.0, foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos, seguidos do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls ou teste de Dunn, baseando-se na continuidade das variáveis em análise. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Curva dose-efeito do CPT-11 em camundongos Swiss

As fotomicrografias (**figura 11**) e os escores histopatológicos (**tabela 2**) indicam que o CPT-11 nas doses de 60 e 75 mg/kg/dia, em comparação com animais tratados apenas com salina ($p < 0,05$), induziu acentuado encurtamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com vacuolização e perda da arquitetura de criptas, vilos e do epitélio de revestimento e infiltração inflamatória na mucosa. Realizando-se a análise morfométrica no duodeno de camundongos Swiss (**figura 12**) tratados com CPT-11, verificou-se que o antineoplásico, em todas as doses testadas (45, 60 e 75 mg/kg) induziu redução significativa ($p < 0,05$) na razão vilo/cripta quando comparados com o controle tratado apenas com salina. Ao ser estudado o padrão de atividade funcional (contratilidade *in vitro* de duodeno) do intestino de animais tratados com CPT-11, verificou-se (**figura 13**) que o CPT-11, também em todas as doses testadas (45, 60 e 75 mg/kg), induziu significativo ($p < 0,05$) aumento da resposta contrátil do duodeno ao estímulo com betanecol, sendo essa resposta, respectivamente para as doses de 45, 60 e 60 mg/kg, 178%, 209% e 319% maior que a contratilidade do duodeno de animais tratados apenas com salina. Os dados estão de acordo com a análise do grau de diarreia apresentada (**tabela 3**) onde se observou que o CPT-11 induziu significativos eventos diarréicos ($p < 0,05$) em todas as doses, comparados ao grupo tratado somente com salina. Como apresentado na **figura 14**, em todas as doses testadas (45, 60 e 75 mg/kg), o CPT-11 induziu de forma significativa ($p < 0,05$) leucopenia nos animais.

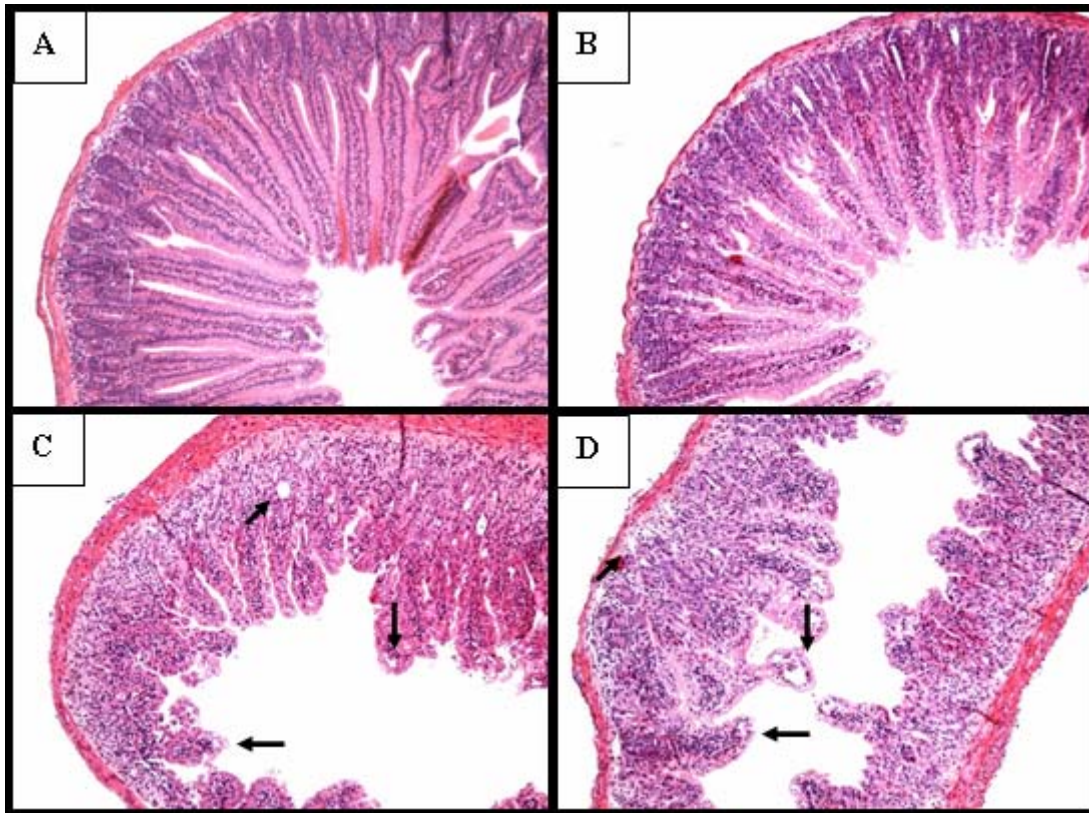


FIGURA 11 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos Swiss injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (45, 60 ou 75 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais que receberam CPT-11 (60 ou 75 mg/kg) os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). **Painel A:** Controle salina; **Painel B:** CPT-11 45 mg/kg; **Painel C:** CPT-11 60 mg/kg; **Painel D:** CPT-11 75 mg/kg.

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 45 mg/kg	2,5(2-3)
CPT-11 60 mg/kg	3(2-4)*
CPT-11 75 mg/kg	4(4-4)*

Tabela 2 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos Swiss

CPT-11 induz alterações histopatológicas em duodeno de camundongos Swiss. O Gráfico revela que o CPT-11, nas doses de 60 e 75 mg/kg, induziu aumento dos escores histopatológicos comparados com os verificados em camundongos tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

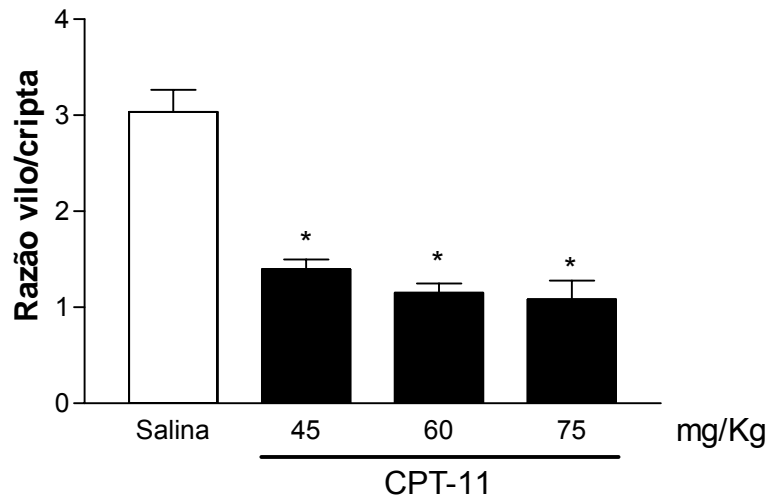


Figura 12 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos Swiss

CPT-11 induz alterações morfométricas em duodeno de camundongos Swiss. O Gráfico revela que o CPT-11, em todas as doses testadas, induz redução da razão vilo/cripta comparada com a verificada em camundongos tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

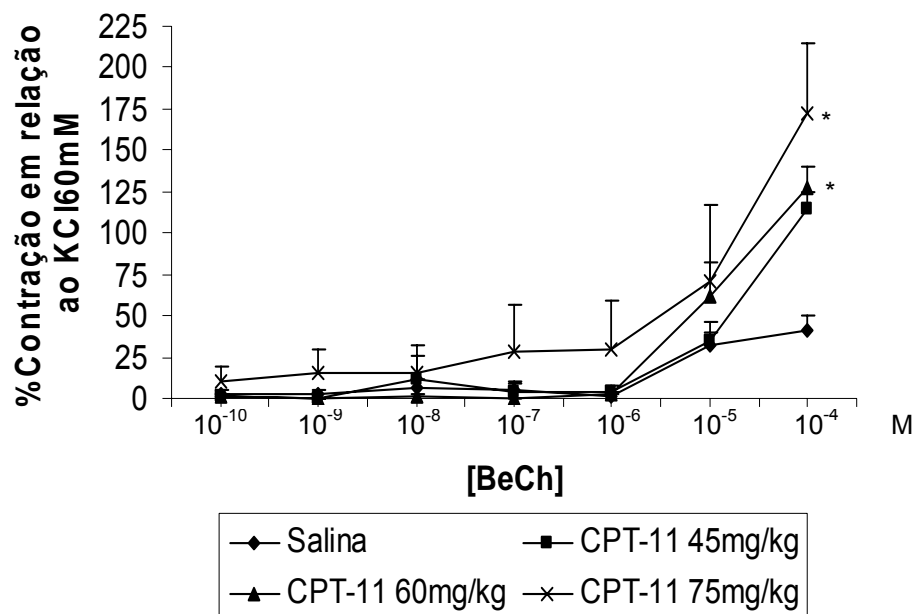


FIGURA 13 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos Swiss

Camundongos Swiss apresentam alterações funcionais na contratilidade *in vitro* de duodeno ao tratamento com CPT-11. O estudo funcional sobre o duodeno coletado de animais tratados com CPT-11 revelou um aumento da responsividade do tecido ao Betanecol (BeCh) na dose de 60 mg/kg quando comparado aos animais tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo controle tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 45 mg/kg	0(0-3)
CPT-11 60 mg/kg	2(0-3)
CPT-11 75 mg/kg	2,5(2-3)*

Tabela 3– Avaliação da diarreia em camundongos Swiss

CPT-11 induz diarreia em camundongos Swiss. O estudo revela que animais (Swiss) tratados com CPT-11 na dose de 75 mg/kg apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

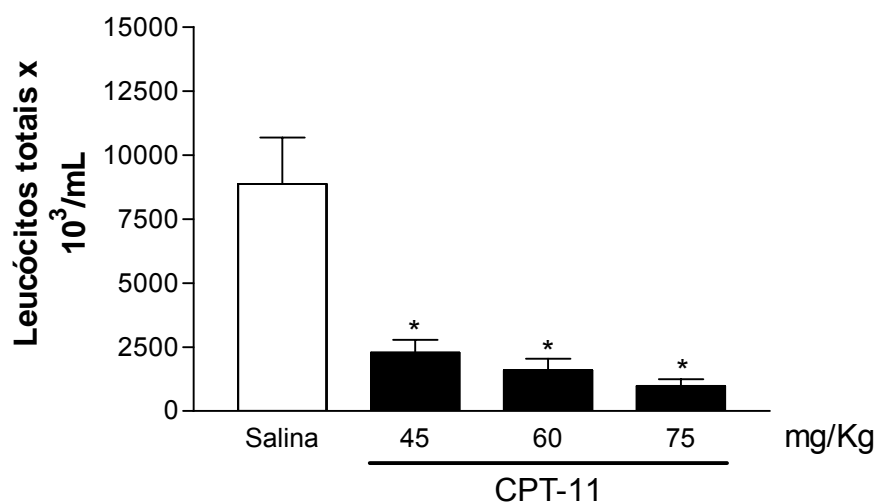


Figura 14 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos Swiss

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos Swiss. A figura apresenta o efeito do CPT-11 sobre o número de leucócitos circulantes, verificando-se leucopenia em todas as doses testadas, indicando a manutenção do efeito da droga relativo ao parâmetro hematológico. * $p < 0,05$ vs animal tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.2. Curva dose-efeito do CPT-11 em camundongos C57BL/6

As fotomicrografias (**figura 15**) e os escores histopatológicos (**tabela 4**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais tratados apenas com salina ($p < 0,05$), induziu acentuado encurtamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilo e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa do epitélio de revestimento. A análise morfométrica de duodeno de camundongos C57BL/6 (**figura 16**) demonstrou que o CPT-11, nas doses testadas (45 e 60 mg/kg), apresentou redução significativa ($p < 0,05$) na relação vilo/cripta quando comparados com o controle tratado apenas com salina. Em adição ao observado na análise morfométrica, a **figura 17** refere que apenas a dose de 60 mg/kg do CPT-11 induziu significativo ($p < 0,05$) aumento da atividade contrátil do duodeno ao estímulo com betanecol, verificada *in vitro*, sendo essa resposta 189% maior que a contratilidade do duodeno de animais tratados apenas com salina. Os dados estão de acordo com a análise do grau de diarreia apresentada (**tabela 5**) onde se observa que somente a dose de 60 mg/kg induziu significativos eventos diarreicos ($p < 0,05$) comparado ao grupo tratado somente com salina. Como apresentado na **figura 18**, em todas as doses testadas (45 e 60 mg/kg), o CPT-11 induziu de forma significativa ($p < 0,05$) leucopenia nos animais, uma característica de drogas antineoplásicas.

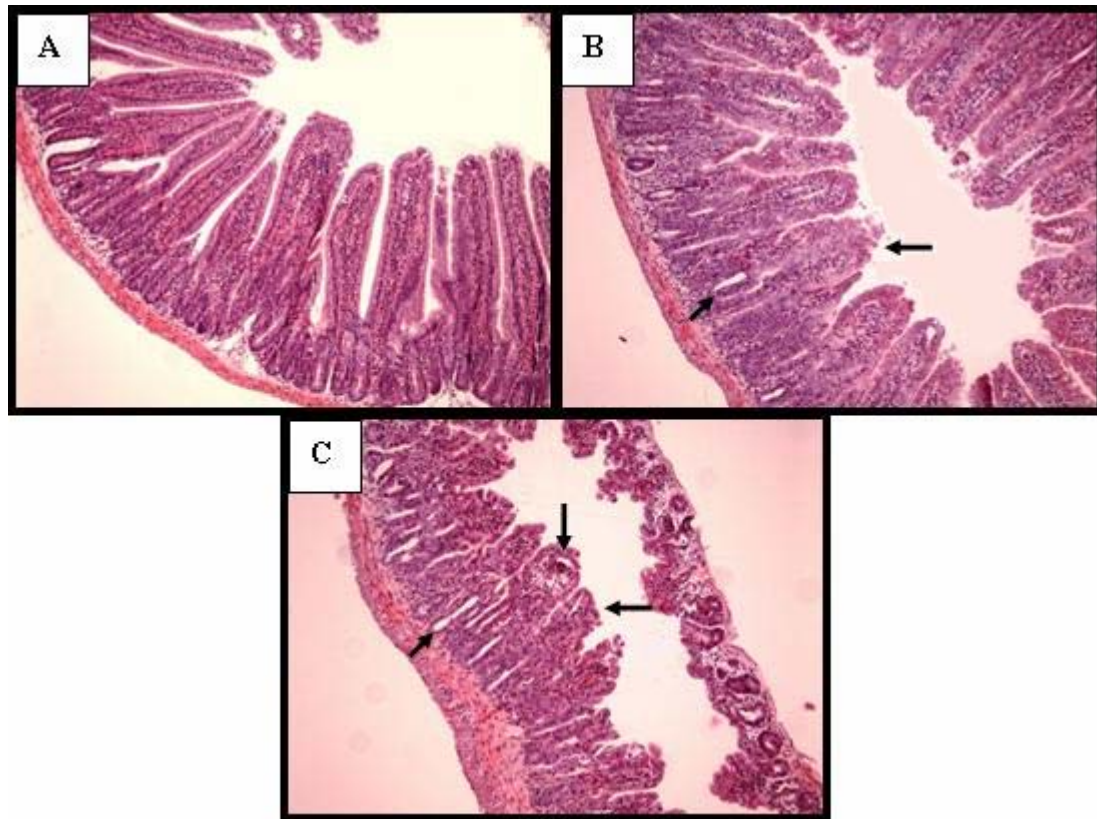


FIGURA 15 - Fotomicrografias de camundongos C57BL/6 injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (45 ou 60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais que receberam CPT-11 (60 mg/kg) os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). Nos animais que receberam CPT-11 45 mg/kg, a mucosa apresenta menor encurtamento de vilos e criptas com maior preservação. **Painel A:** Controle salina; **Painel B:** CPT-11 45 mg/kg; **Painel C:** CPT-11 60 mg/kg.

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 45 mg/kg	2(2-2)
CPT-11 60 mg/kg	3(2-4)*

Tabela 4– Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos C57BL

CPT-11 induz alterações histopatológicas em duodeno de camundongos C57BL/6. O Gráfico revela que o CPT-11, na dose de 60 mg/kg, induziu aumento dos escores histopatológicos comparados com os verificados em camundongos tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

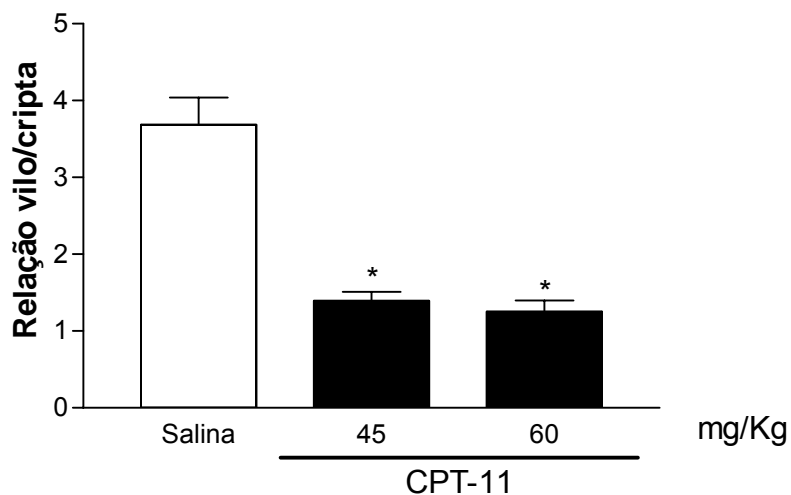


Figura 16 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos C57BL/6

CPT-11 induz alterações morfométricas em duodeno de camundongos C57BL/6. O Gráfico revela que o CPT-11, em todas as doses testadas, induz redução da razão vilo/cripta comparada com a verificada em camundongos tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

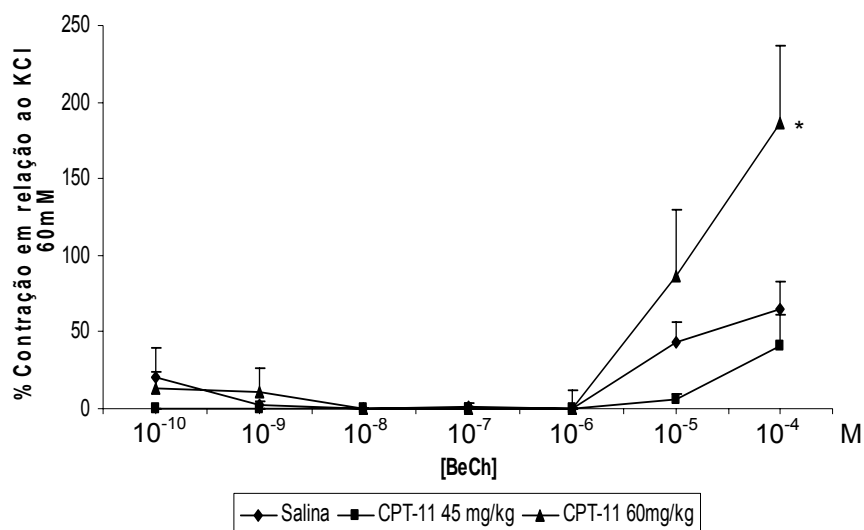


FIGURA 17 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos C57BL/6

Camundongos C57BL/6 apresentam alterações funcionais na contratilidade *in vitro* de duodeno ao tratamento com CPT-11. O estudo funcional sobre o duodeno coletado de animais tratados com CPT-11 revelou um aumento da responsividade do tecido ao Betanecol (BeCh) na dose de 60 mg/kg quando comparado aos animais tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo controle tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escores para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 45 mg/kg	0,5(0-3)
CPT-11 60 mg/kg	2,5(2-3)*

Tabela 5– Avaliação da diarreia em camundongos C57BL/6

CPT-11 induz diarreia em camundongos C57BL/6. Os animais foram tratados por 4 dias com salina (5 mL/kg, i.p.) ou CPT-11 (45 ou 60 mg/kg, i.p.) e foram observados no quinto dia após a primeira dose para determinação do grau de diarreia apresentado. O estudo revela que animais (C57BL/6) tratados com CPT-11 na dose de 60 mg/kg apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

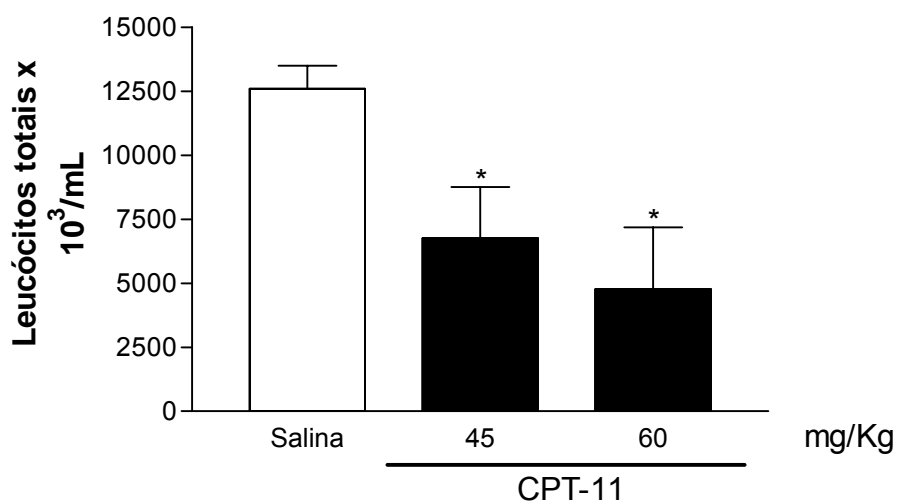


Figura 18 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos C57BL/6

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos C57BL/6. A figura apresenta o efeito do CPT-11 sobre o número de leucócitos circulantes, verificando-se leucopenia em todas as doses testadas, indicando a manutenção do efeito da droga relativo ao parâmetro hematológico. * $p < 0,05$ vs animal tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.3. Avaliação da participação da caspase-1 na mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 19**) e os escores histopatológicos (**tabela 6**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais WT (C57BL/6) tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilos e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitélio de revestimento. Em animais *knockout* para caspase-1, *caspase-1^{-/-}*, aos quais foi administrado CPT-11, observaram-se grandes áreas de vacuolização em criptas e presença de células apoptóticas, bem como acentuado encurtamento de vilos em algumas regiões e preservação em outras quando comparados aos correspondentes *knockout* tratados apenas com salina. Contudo, baseado nos critérios adotados por Woo et al. (2000) houve marcante perda de arquitetura tecidual. A análise morfométrica (**figura 20**) revelou que o tratamento dos animais selvagens (Caspase-1 WT) com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) induziu uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilos/cripta quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A **figura 20** apresenta também que animais *caspase-1^{-/-}* que receberam CPT-11, não desenvolveram alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 21**, e da atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), **figura 22**, em animais selvagens (caspase-1 wt) comparados com animais selvagens tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). Esses efeitos não foram verificados nos animais *caspase-1^{-/-}*, a despeito do tratamento com CPT-11, ($p > 0,05$) comparados com animais *knockout* que receberam somente salina. O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 23**) e a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 7**) demonstraram que o CPT-11 induziu significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, em animais caspase-1 WT quando comparado com o grupo selvagem tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, a administração do CPT-11 a animais *caspase-1^{-/-}* não foi capaz de induzir alterações funcionais ou diarreia, quando

comparado ao grupo *knockout* que recebeu apenas salina ($p>0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 24**) tanto em animais selvagens (caspase-1 WT) como em animais *knockout*, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p<0,05$).

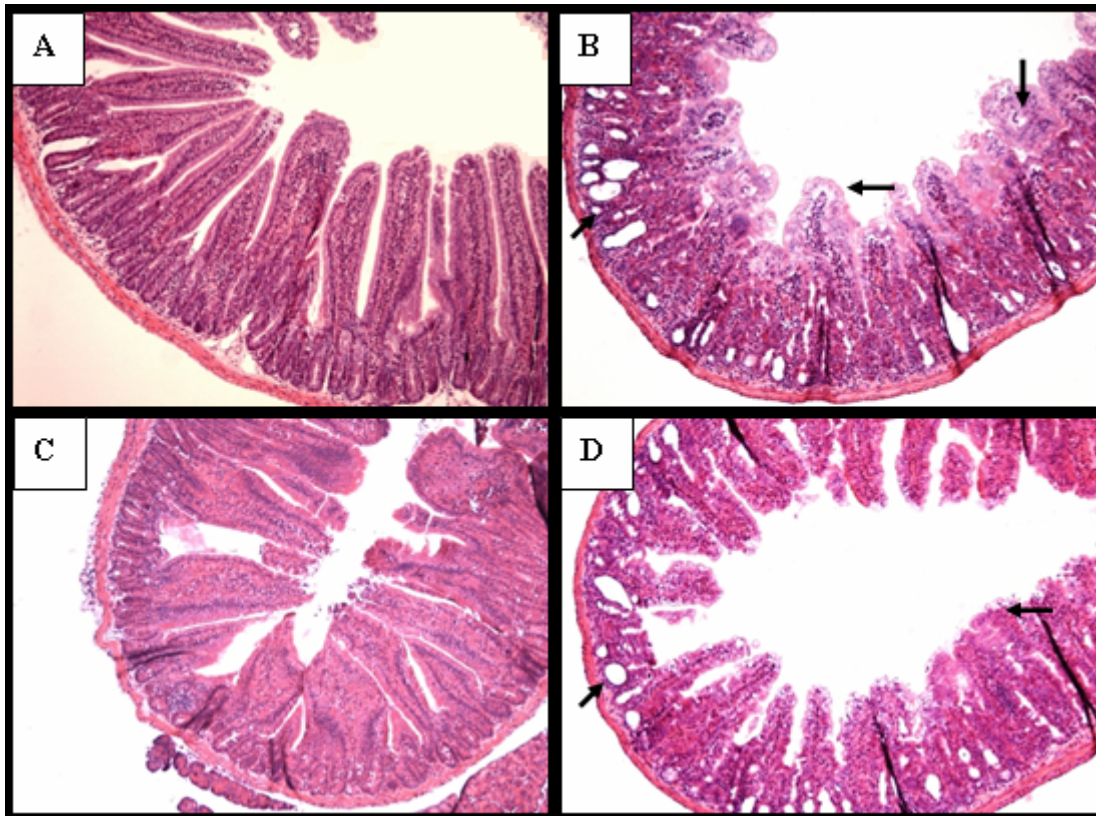


FIGURA 19 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos Caspase-1 *knockout* injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais caspase-1 WT que receberam CPT-11 (60 mg/kg) os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). Em animais caspase-1 *knockout* (caspase-1^{-/-}) há perda localizada de vilos e intensa necrose de criptas (seta diagonal). **Painel A:** Caspase-1 WT+salina; **Painel B:** Caspase-1 WT+CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** Caspase-1^{-/-} +salina; **Painel D:** Caspase-1^{-/-} +CPT-11 60 mg/kg

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Caspase-1 WT	0(0-0)
Caspase-1 WT + CPT-11 60 mg/kg	3(2-4) ^a
Caspase-1 ^{-/-}	0(0-0)
Caspase-1 ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	4(3-4) ^b

Tabela 6– Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos caspase-1^{-/-}

Camundongos caspase-1^{-/-} apresentam alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que o tratamento dos animais selvagens (C57BL/6-Caspase-1 WT) com CPT-11 induz aumento dos escores histopatológicos quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais caspase-1^{-/-}, que receberam CPT-11, desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. ^ap<0,05 vs grupo caspase-1 WT tratado com salina; ^bp<0,05 vs grupo caspase-1^{-/-} tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

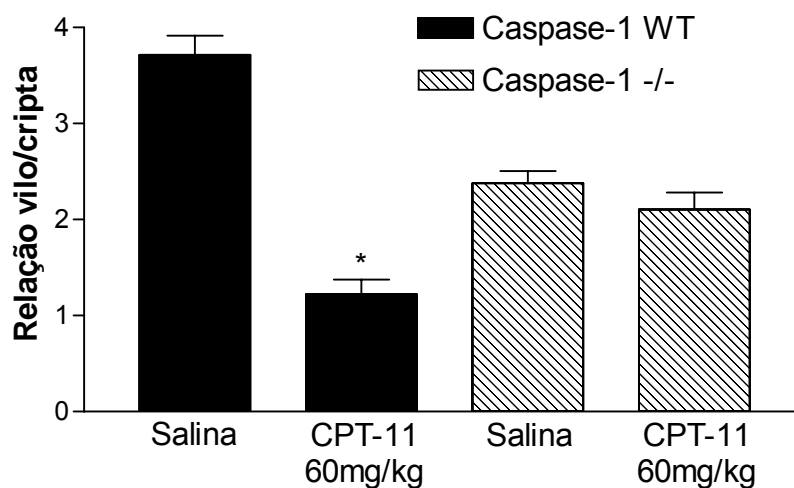


Figura 20 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos Caspase-1^{-/-}

Camundongos caspase-1^{-/-} não desenvolvem alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que o tratamento dos animais selvagens (C57BL/6-Caspase-1 WT) com CPT-11 induz uma redução na razão vilo/cripta quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais caspase-1^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo caspase-1 WT tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

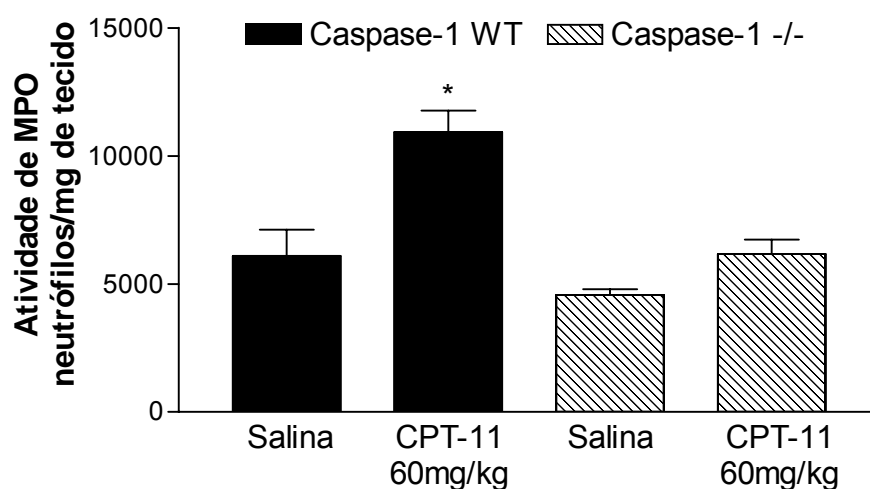


FIGURA 21 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos Caspase-1^{-/-}

Animais caspase-1^{-/-} não apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais selvagens tratados com o antineoplásico comparados com animais selvagens tratados somente com salina. Esse efeito não foi verificado nos animais caspase-1^{-/-}, a despeito do tratamento com CPT-11. * $p < 0,05$ vs grupo caspase-1 selvagem (C57BL/6 - caspase-1 WT) tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

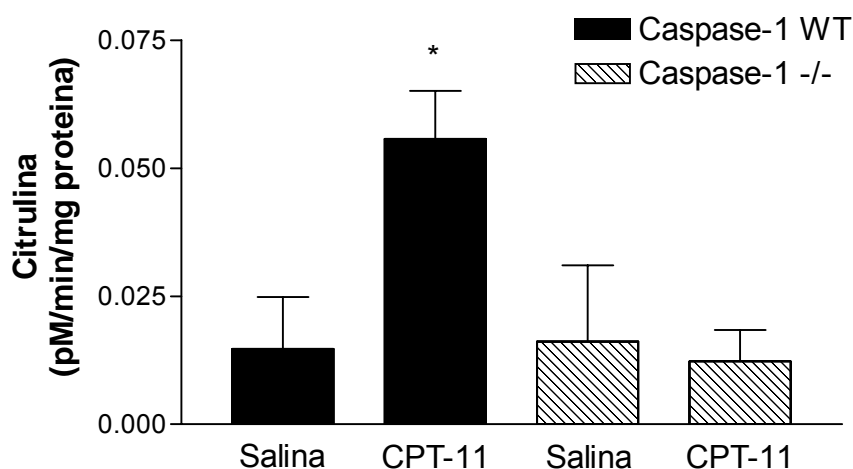


FIGURA 22 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de iNOS duodenal em camundongos caspase-1^{-/-}

Animais caspase-1^{-/-} não desenvolvem aumento da atividade de iNOS a despeito da injeção de CPT-11. O teste revelou que o tratamento dos animais selvagens (C57BL/6-WT) com CPT-11 induz um aumento na atividade da enzima quando comparado com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais caspase-1^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolvem aumento da atividade de iNOS em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs Caspase-1 WT tratados com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

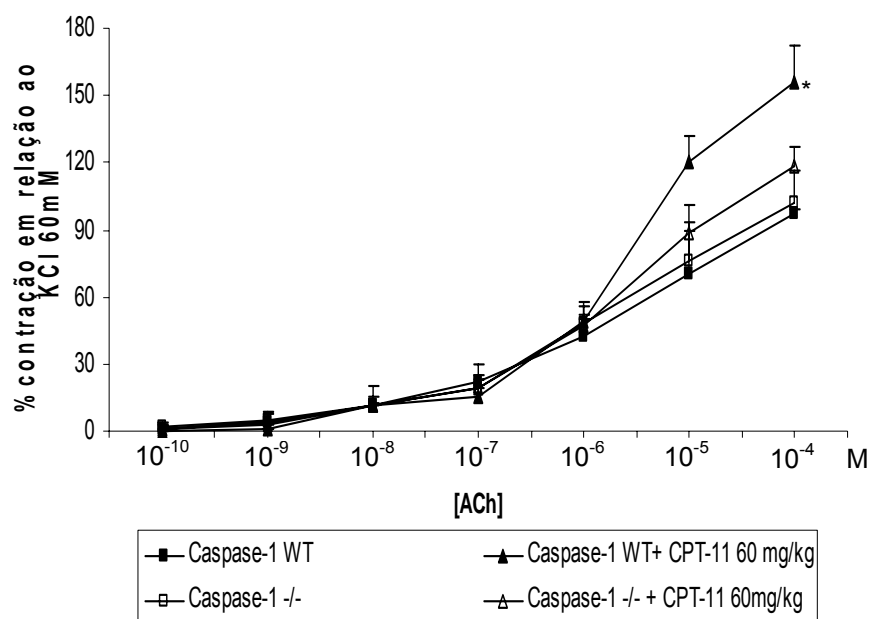


FIGURA 23 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos caspase-1^{-/-}

Deleção para Caspase-1 é fator protetor contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais selvagens tratados com CPT-11 (caspase-1 WT+CPT-11) revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina (Caspase-1 WT). Contudo, a administração do CPT-11 aos animais caspase-1^{-/-} não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais *knockout* para o mesmo gene tratados somente com salina (caspase-1^{-/-}). *p<0,05 vs grupo caspase-1 selvagem (C57BL/6, WT) tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Caspase-1 WT	0(0-0)
Caspase-1 WT + CPT-11 60 mg/kg	3(1-3)*
Caspase-1 ^{-/-}	0(0-0)
Caspase-1 ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	1,5(1-3)

Tabela 7– Avaliação da diarreia em camundongos caspase-1^{-/-}

Animais caspase-1^{-/-} não desenvolvem diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais selvagens (C57BL/6, WT) tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais selvagens tratados apenas com salina (caspase-1 WT). Contudo, a administração do CPT-11 aos animais caspase-1^{-/-} não foi capaz de promover aumentos significativos na mediana dos escores em comparação com animais *knockout* tratados somente com salina.* p<0,05 vs grupo caspase-1 WT. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

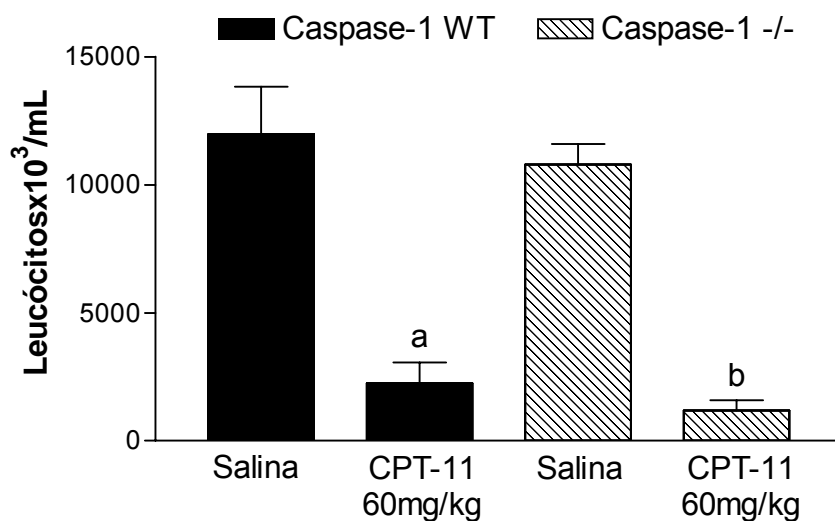


Figura 24 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos Caspase-1^{-/-}

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos Caspase-1^{-/-}. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais selvagens (C57BL/6-WT) como em animais *knockout* para caspase-1 indicando a manutenção do efeito da droga sobre a redução do número de leucócitos circulantes a despeito do tipo de animal. ^ap<0,05 vs grupo Caspase-1 Wild Type; ^bp<0,05 vs grupo caspase-1^{-/-}. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.4. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) sobre a mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 25**) e os escores histopatológicos (**tabela 8**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais BALB/c tratados apenas com salina, induziu em animais tratados ou não com IL-1Ra acentuado encurtamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta, vacuolização de cripta e vilos e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade do epitélio de revestimento. A análise morfométrica (**figura 26**) revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.), e que receberam o veículo da IL-1Ra (H_2O_{dest}) ou IL-1Ra (50 mg/kg, s.c., 2x ao dia), induziu uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilos/cripta quando comparados com os respectivos animais controle tratados somente com salina. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 27**, tanto em animais tratados com o veículo da IL-1Ra como nos que receberam IL-1Ra, comparados com os respectivos grupos controle tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 28**) e a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 9**) demonstraram que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, em animais tratados com o veículo da IL-1Ra (H_2O_{dest}) e nos tratados com IL-1Ra, quando comparados com os respectivos grupos tratados apenas com salina ($p < 0,05$). Adicionalmente, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 29**) tanto em animais tratados com o veículo da IL-1Ra (H_2O_{dest}) como com IL-1Ra, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p < 0,05$).

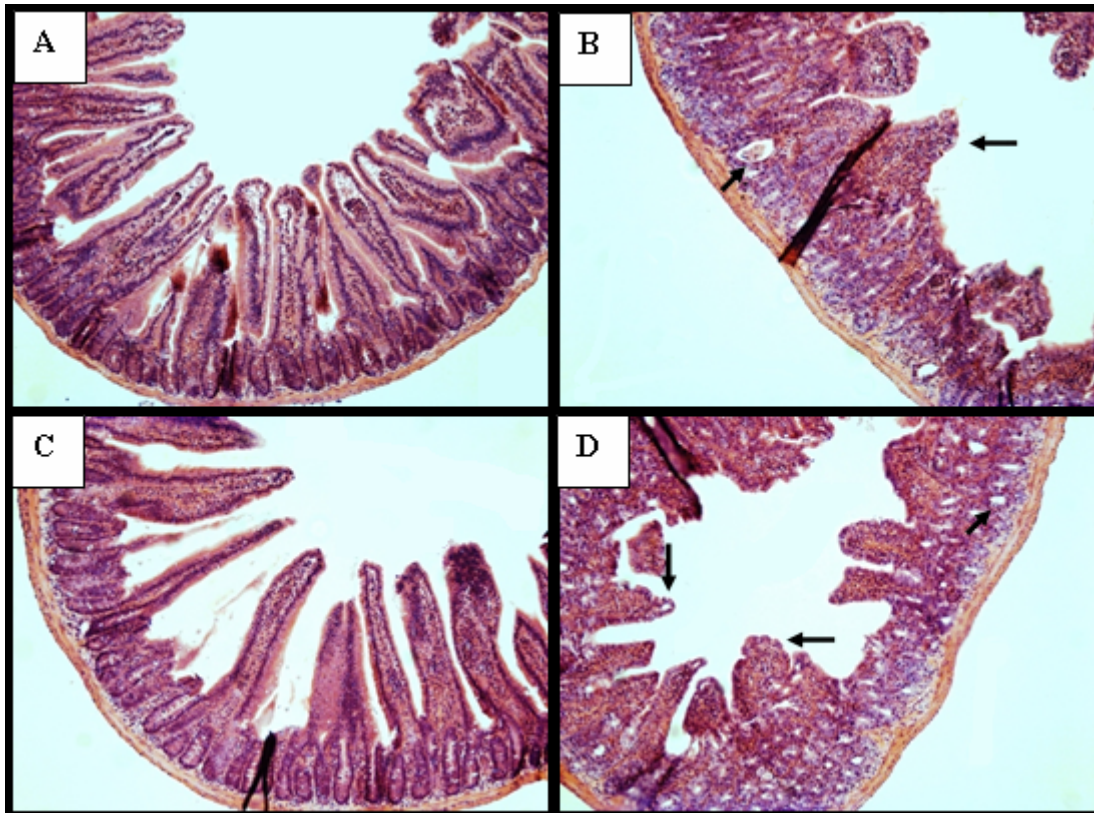


FIGURA 25 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com IL-1Ra injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais que receberam CPT-11 (60 mg/kg) tratados ou não com IL-1Ra, os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). **Painel A:** salina; **Painel B:** CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** IL-1Ra +salina; **Painel D:** IL-1Ra +CPT-11 60 mg/kg

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(1-4) ^a
IL-1Ra	0(0-1)
IL-1Ra + CPT-11 60 mg/kg	4(3-4) ^b

Tabela 8– Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com IL-1Ra

IL-1ra não previne o desenvolvimento de alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que a injeção de CPT-11 a animais tratados ou não com IL-1Ra induz aumento dos escores histopatológicos quando comparados com animais tratados somente com salina ou IL-1Ra. ^ap<0,05 vs grupo tratado com salina e veículo de IL-1Ra, que não recebeu CPT-11; ^bp<0,05 vs grupo salina tratado com IL-1Ra e que recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

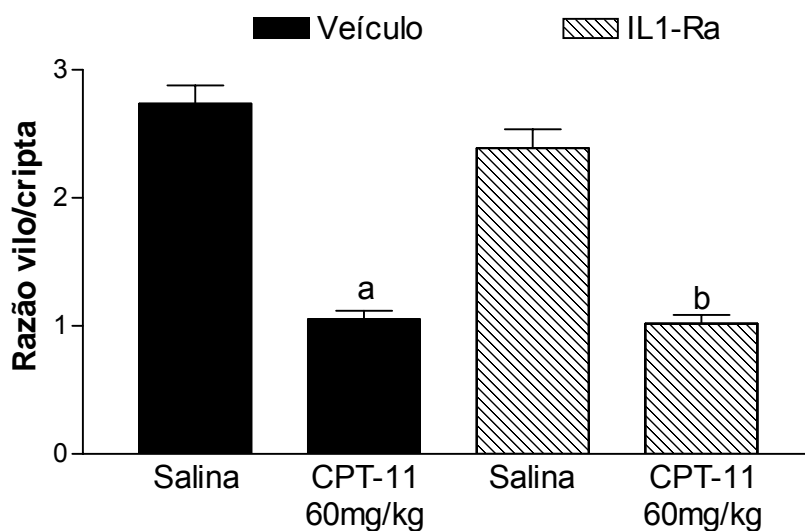


Figura 26 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/crípta em camundongos tratados com IL-1Ra

IL-1ra não previne o desenvolvimento de alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que a injeção de CPT-11 a animais tratados ou não com IL-1Ra induz uma redução na razão vilo/crípta quando comparados com animais tratados somente com salina e que receberam veículo ou IL-1Ra. ^a $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina e veículo de IL-1Ra, que não recebeu CPT-11; ^b $p < 0,05$ vs grupo salina tratado com IL-1Ra e que recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

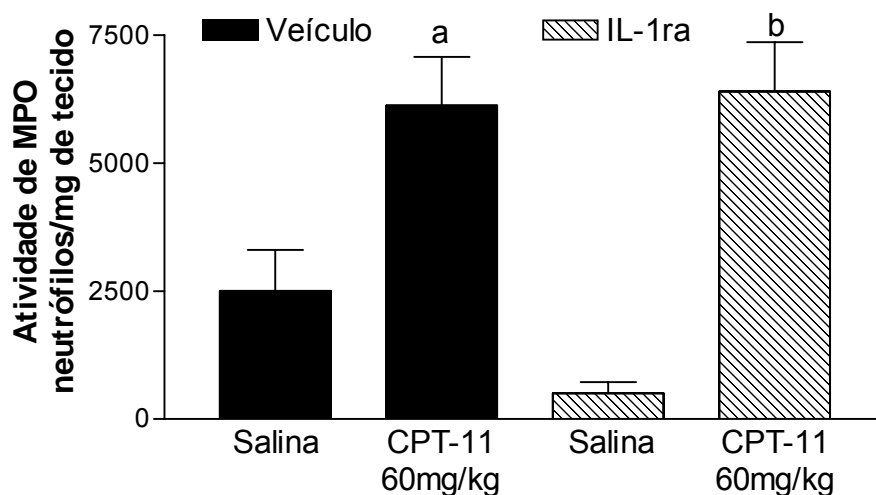


FIGURA 27 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com IL-1Ra

Tratamento com IL-1Ra não previne aumento da atividade de MPO no duodeno na mucosite por CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais tratados com o antineoplásico comparados com animais tratados somente com salina, tanto em animais que receberam ou não o IL-1Ra. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina i.p tratado com veículo (Salina s.c.); ^b $p < 0,05$ vs IL-1Ra que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

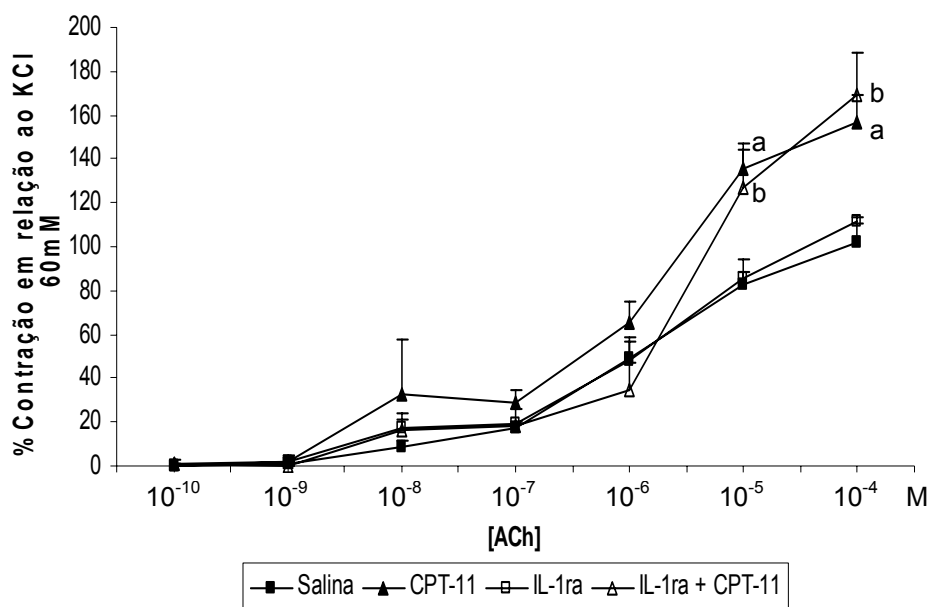


FIGURA 28 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos tratados com IL-1Ra

Tratamento de camundongos com IL-1Ra não previne o desenvolvimento de alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais tratados ou não com IL-1Ra e que receberam CPT-11 revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina ou com IL-1Ra. ^ap<0,05 vs grupo salina i.p tratado com veículo (Salina s.c.); ^bp<0,05 vs IL-1Ra que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	2(2-3) ^a
IL-1Ra	0(0-0)
IL-1Ra + CPT-11 60 mg/kg	2(2-3) ^b

Tabela 9– Avaliação da diarreia em camundongos tratados com IL-1Ra

Tratamento de animais com IL-1Ra não previne o desenvolvimento de diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais que receberam salina ou IL-1Ra e que foram tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais que não receberam o antineoplásico. ^ap<0,05 vs grupo salina i.p tratado com veículo (Salina s.c.); ^bp<0,05 vs IL-1Ra que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

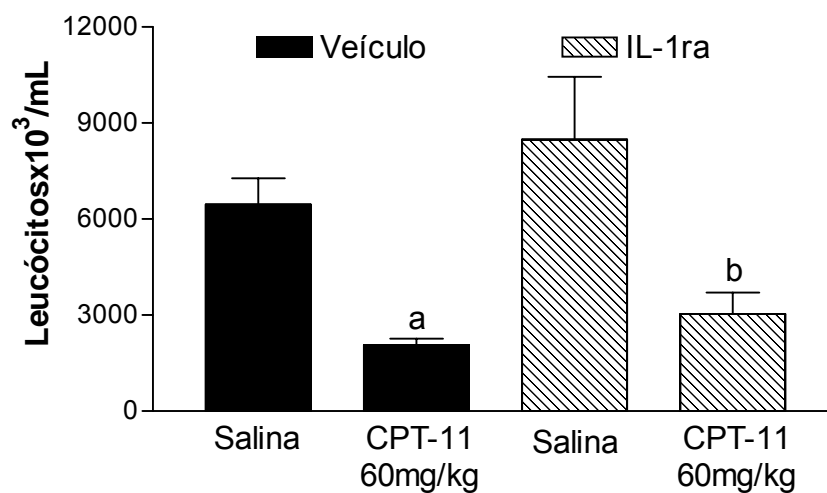


Figura 29 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com IL-1Ra

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos tratados com IL-1Ra. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais selvagens (BALB/c, WT) como em animais tratados com IL-1Ra indicando a manutenção do efeito da droga na redução do número de leucócitos circulantes. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina i.p tratado com veículo (Salina s.c.); ^b $p < 0,05$ vs IL-1Ra que não recebeu CPT-11 (60 mg/kg i.p.). Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.5. Avaliação da participação da IL-18 na mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 30**) e os escores histopatológicos (**tabela 10**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais WT (BALB/c) tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilo e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitélio de revestimento. Em animais *knockout* para interleucina-18, IL-18^{-/-}, aos quais foi administrado CPT-11, observou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes *knockout* tratados apenas com salina. A análise morfométrica (**figura 31**) revelou que o tratamento dos animais selvagens (IL-18 WT) com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) induziu uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilo/cripta quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A **figura 31** apresenta também que animais IL-18^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolveram alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 32**, e da atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), **figura 33**, em animais selvagens (IL-18 WT) comparados com animais selvagens tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p). Esses efeitos não foram verificados nos animais IL-18^{-/-}, a despeito do tratamento com CPT-11 ($p > 0,05$), comparados com animais *knockout* que receberam somente salina. O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 34**) e a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 11**) demonstraram que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, em animais IL-18 WT quando comparado com o grupo selvagem tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, a administração do CPT-11 a animais IL-18^{-/-} não foi capaz de induzir alterações funcionais ou diarreia, quando comparado ao grupo *knockout* que recebeu apenas salina ($p > 0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu significativa

leucopenia (**figura 35**) tanto em animais selvagens (IL-18 WT) como em animais *knockout*, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p < 0,05$).

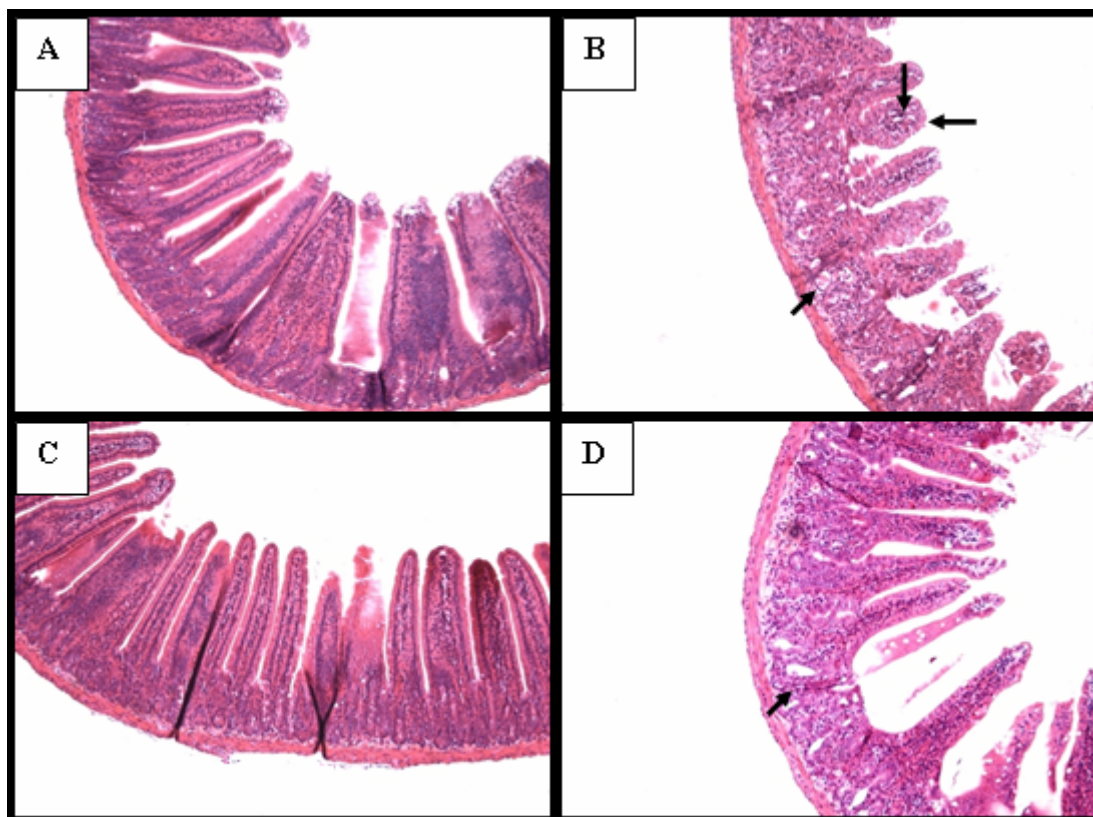


FIGURA 30 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos IL-18 *knockout* injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais IL-18 WT que receberam CPT-11 (60 mg/kg) os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). Em animais IL-18 *knockout* (IL-18^{-/-}) há maior preservação da arquitetura tecidual com necrose focal de criptas (seta diagonal). **Painel A:** IL-18 WT+salina; **Painel B:** IL-18 WT+CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** IL-18^{-/-} +salina; **Painel D:** IL-18^{-/-} +CPT-11 60 mg/kg

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
IL-18 WT	0(0-0)
IL-18 WT + CPT-11 60 mg/kg	3(1-4)*
IL-18 ^{-/-}	0(0-0)
IL-18 ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	1,5(1-4)

Tabela 10 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos IL-18^{-/-}

Camundongos IL-18^{-/-} não desenvolvem alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que o tratamento dos animais selvagens (BALB/c, WT) com CPT-11 induz aumento nos escores histopatológicos quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais IL-18^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. * p<0,05 vs grupo IL-18 WT tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

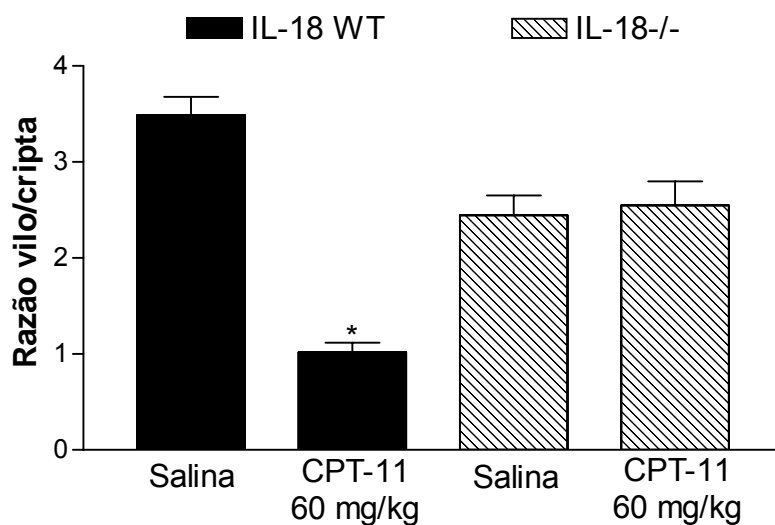


Figura 31 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilos/cripta em camundongos IL-18^{-/-}

Camundongos IL-18^{-/-} não desenvolvem alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que o tratamento dos animais selvagens (BALB/c, WT) com CPT-11 induz uma redução na razão vilos/cripta quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais IL-18^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo IL-18 WT tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

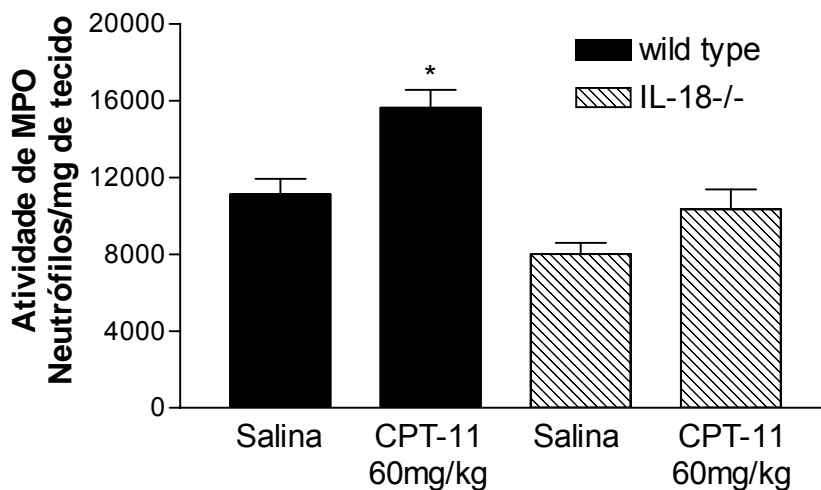


FIGURA 32 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos IL-18^{-/-}

Animais IL-18^{-/-} não apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais selvagens tratados com o antineoplásico (IL-18 WT+CPT-11) comparados com animais selvagens tratados somente com salina (IL-18 WT). Esse efeito não foi verificado nos animais IL-18^{-/-}, a despeito do tratamento com CPT-11. * $p < 0,05$ vs grupo IL-18 selvagem (BALB/c, WT) tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

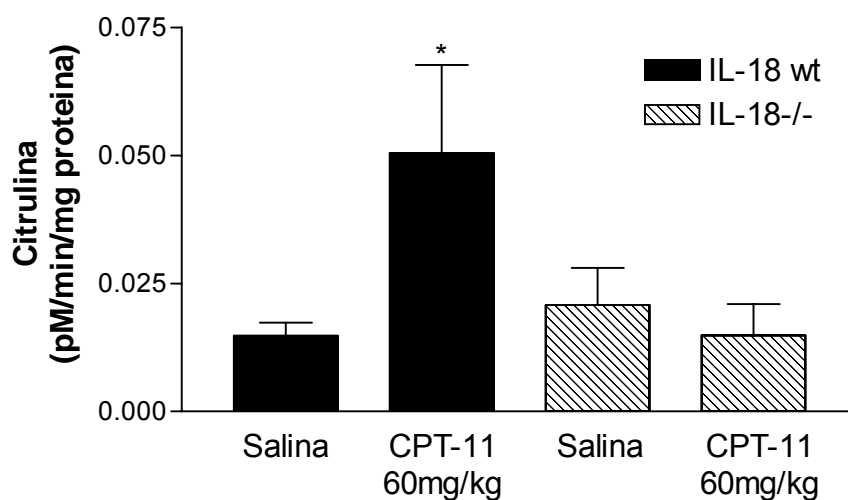


FIGURA 33 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de iNOS duodenal em camundongos IL-18^{-/-}

Animais IL-18^{-/-} não desenvolvem aumento da atividade de iNOS a despeito da injeção de CPT-11. O teste revelou que o tratamento dos animais selvagens (BALB/c, WT) com CPT-11 induz um aumento na atividade da enzima quando comparado com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais IL-18^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolvem aumento da atividade de iNOS em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs IL-18 WT tratados com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

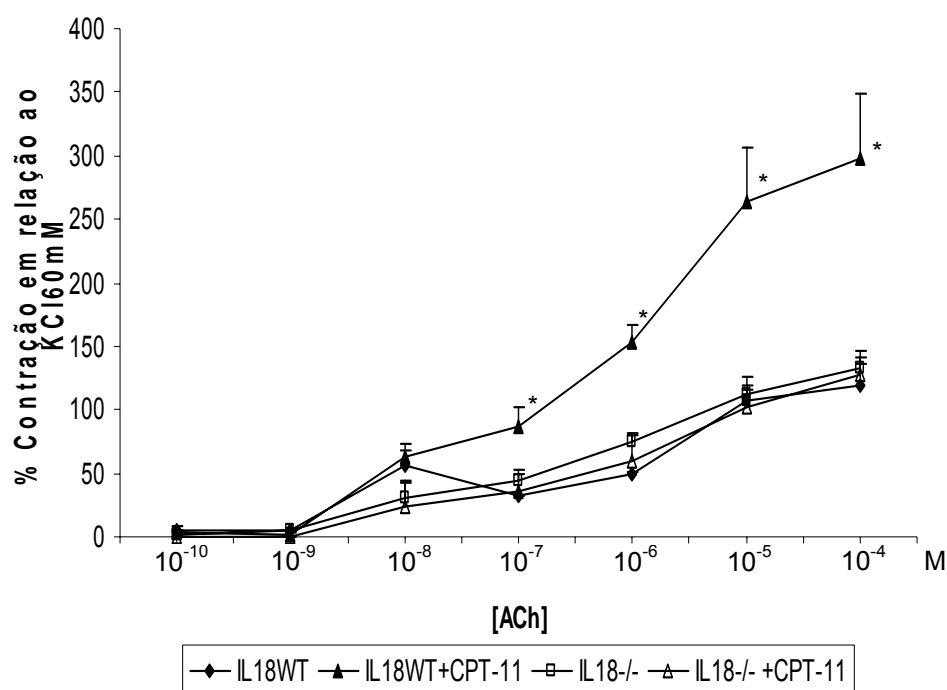


FIGURA 34 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos IL-18^{-/-}

Deleção para IL-18 é fator protetor contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais selvagens tratados com CPT-11 (IL-18 WT+CPT-11) revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina (IL-18 WT). Contudo, a administração do CPT-11 aos animais IL-18^{-/-} não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais *knockout* para o mesmo gene tratados somente com salina (IL-18^{-/-}). *p<0,05 vs grupo IL-18 selvagem (BALB/c, WT) tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
IL-18 WT	0(0-0)
IL-18 WT + CPT-11 60 mg/kg	1(1-2)*
IL-18 ^{-/-}	0(0-0)
IL-18 ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	0(0-2)

Tabela 11 – Avaliação da diarreia em camundongos IL-18^{-/-}

Animais IL-18^{-/-} não desenvolvem diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais selvagens (BALB/c, WT) tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais selvagens tratados apenas com salina (IL-18 WT). Contudo, a administração do CPT-11 aos animais IL-18^{-/-} não foi capaz de promover aumentos significativos na mediana dos escores em comparação com animais *knockout* tratados somente com salina.* p<0,05 vs grupo IL-18 WT. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

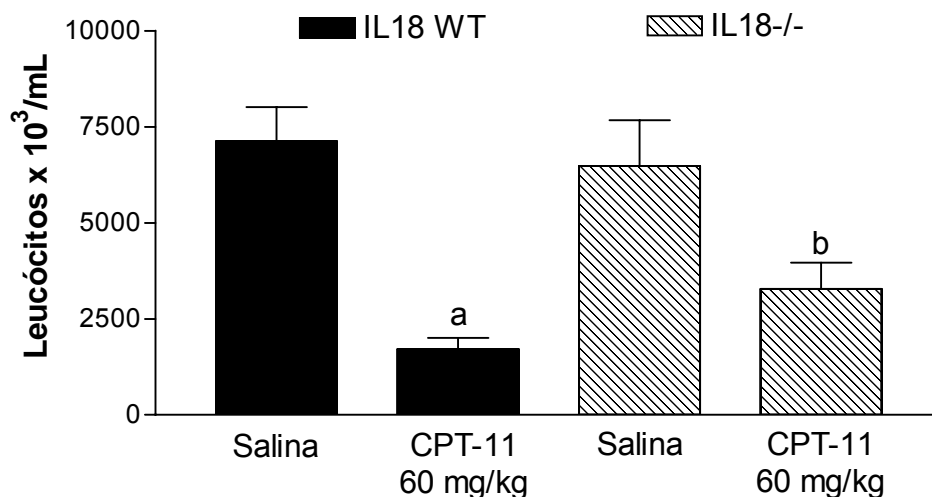


Figura 35 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos IL-18^{-/-}

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos IL-18^{-/-}. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais selvagens (BALB/c, WT) como em animais *knockout* para IL-18 indicando a manutenção do efeito da droga sobre a redução do número de leucócitos circulantes a despeito do tipo de animal. ^a $p < 0,05$ vs grupo IL-18 Wild Type não tratado com CPT-11; ^b $p < 0,05$ vs grupo IL-18^{-/-} não tratado com CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.6. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com a proteína ligante de IL-18 (IL-18bp) sobre a mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 36**) e os escores histopatológicos (**tabela 12**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais BALB/c tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilos e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitélio de revestimento. Em animais tratados com proteína ligante de IL-18, IL-18bp, aos quais foi administrado CPT-11, observou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos animais tratados apenas com CPT-11. A análise morfométrica (**figura 37**) revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) induz uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilos/cripta quando comparados com animais tratados somente com salina. Porém, a administração de IL-18bp confere significativa proteção contra as alterações morfométricas ($p < 0,05$) induzidas por CPT-11, comparada com o grupo tratado apenas com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 38**, e da atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), **figura 39**, comparados com animais tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). Esses efeitos foram atenuados nos animais que receberam IL-18bp, a despeito do tratamento com CPT-11 ($p < 0,05$), comparados com animais que receberam somente CPT-11. O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 40**) e a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 13**) demonstraram que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, quando comparado com o grupo tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, verificou-se um grau significativamente atenuado de alteração ao nível funcional e de diarreia apresentados pelos animais quando administrada IL-18bp em comparação com o grupo que recebeu apenas CPT-11 ($p < 0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 41**) tanto em animais tratados com salina como nos que

receberam IL-18bp, comparados com o controle tratado apenas com salina ($p < 0,05$).

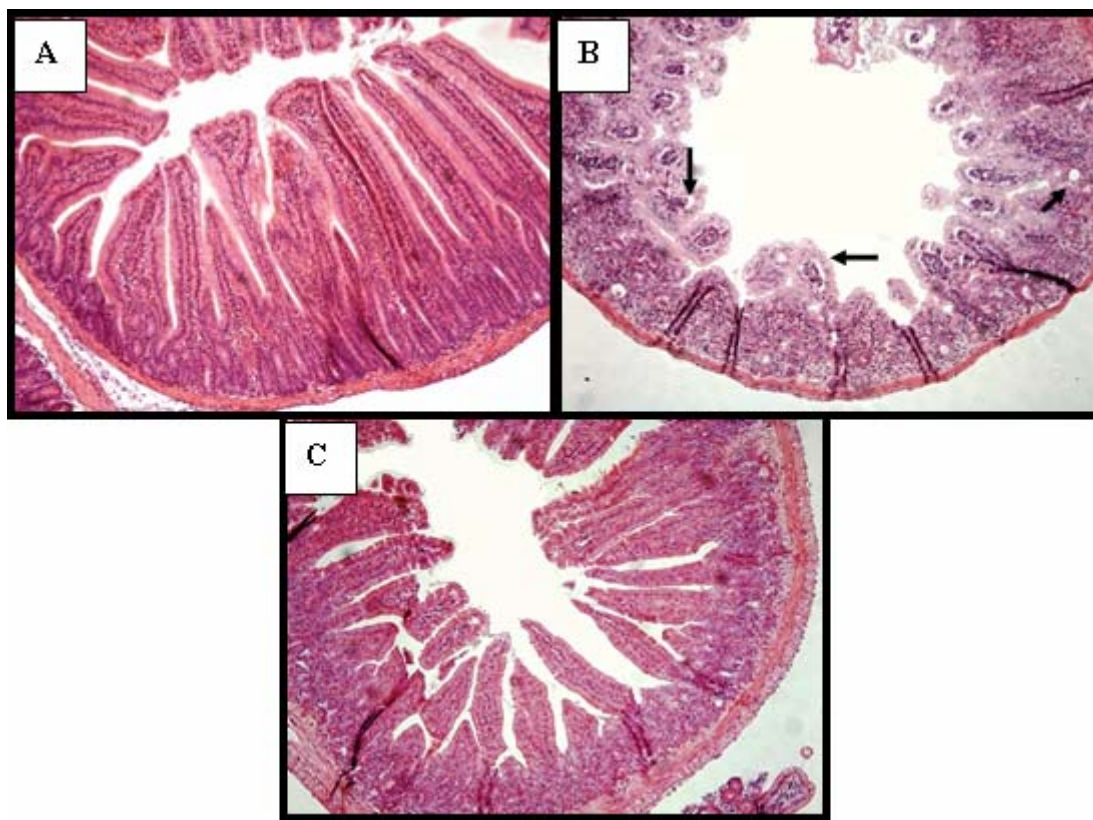


FIGURA 36 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com IL-18bp e injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais que receberam CPT-11 (60 mg/kg) não tratados com IL-18bp, os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). Em animais tratados com IL-18bp, apesar de receberem CPT-11, há preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** salina; **Painel B:** CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** IL-18bp+CPT-11 60 mg/kg

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(1-4)*
IL-18bp + CPT-11 60 mg/kg	2(1-2)

Tabela 12 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com IL-18bp

IL-18bp previne o desenvolvimento de alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que a injeção de CPT-11 induz aumento dos escores histopatológicos quando comparados com animais tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais pré-tratados com IL-18bp e que receberam CPT-11 não desenvolvem alterações intensas nesses parâmetros em comparação com animais pré-tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina, que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

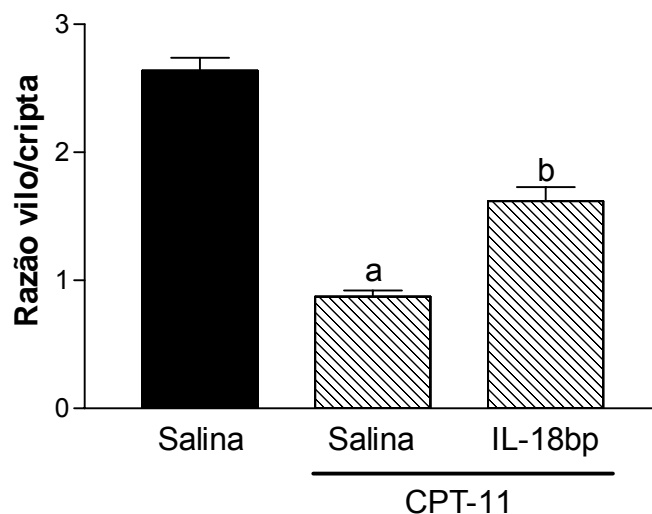


Figura 37 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilos/críptas em camundongos tratados com IL-18bp

IL-18bp previne o desenvolvimento de alterações morfométricas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfométrica revelou que a injeção de CPT-11 induz uma redução na razão vilos/críptas quando comparados com animais tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais pré-tratados com IL-18bp e que receberam CPT-11 não desenvolvem alterações profundas nesses parâmetros em comparação com animais pré-tratados apenas com salina e que receberam CPT-11. ^a $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina, que não recebeu CPT-11; ^b $p < 0,05$ vs grupo salina que recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

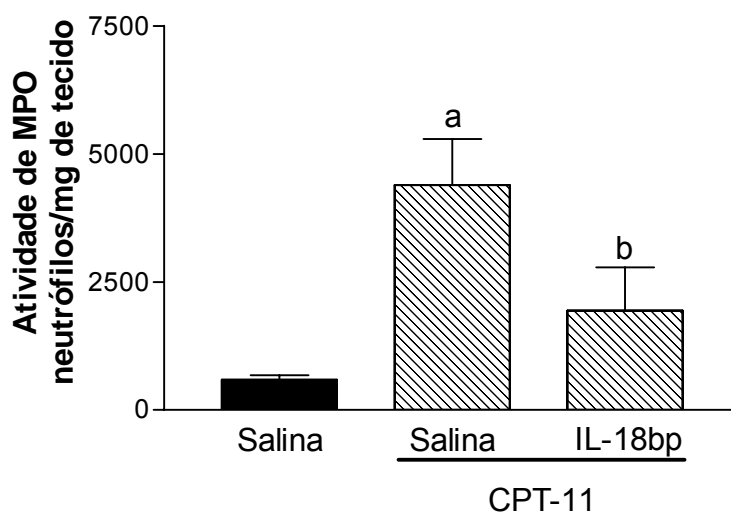


FIGURA 38 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com IL-18bp

Animais tratados com IL-18bp não apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais tratados somente com o antineoplásico e pré-tratados com salina (salina+CPT-11) comparados com animais tratados somente com salina. Esse efeito não foi verificado nos animais pré-tratados com IL-18bp, a despeito do tratamento com CPT-11. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

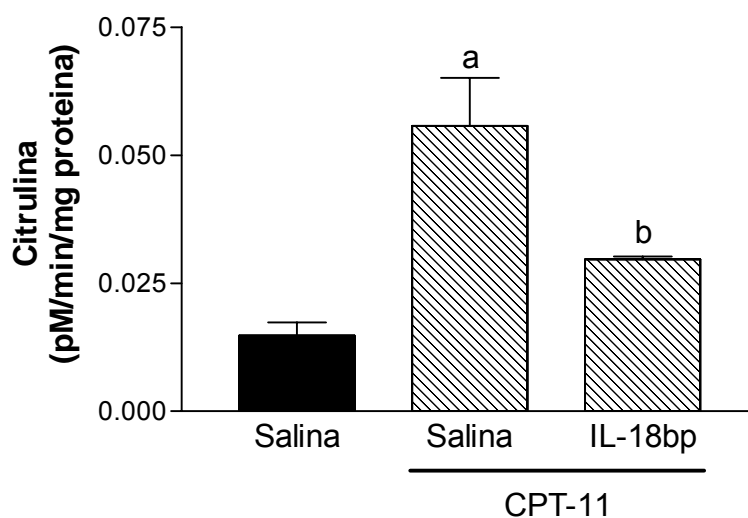


FIGURA 39 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de iNOS duodenal em camundongos tratados com IL-18bp

Animais tratados com IL-18bp não desenvolvem aumento da atividade de iNOS a despeito da injeção de CPT-11. O teste revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (salina+CPT-11) induz um aumento na atividade da enzima quando comparado com animais tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais tratados com IL-18bp, que receberam CPT-11, não desenvolvem aumento da atividade de iNOS em comparação com animais pré-tratados apenas com salina e que receberam CPT-11. ^a $p < 0,05$ vs salina; ^b $p < 0,05$ vs CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

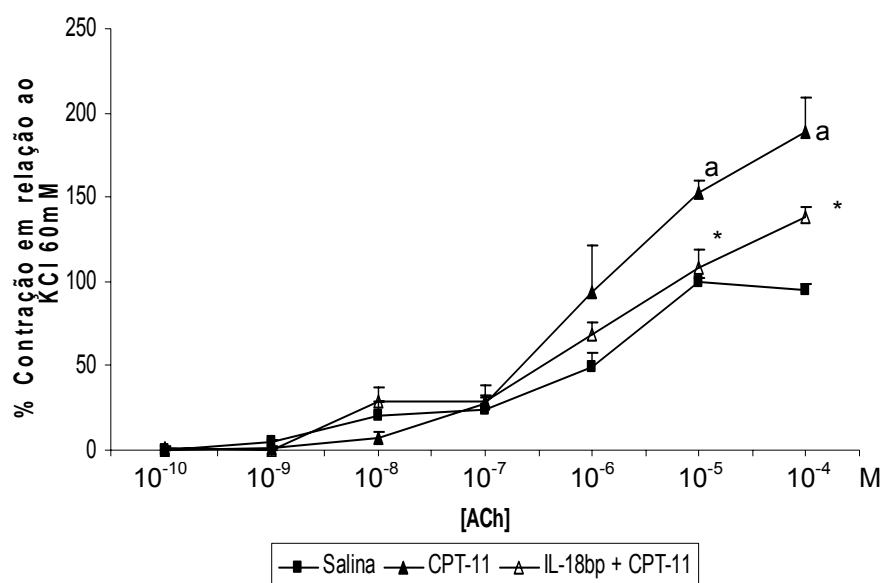


FIGURA 40 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos tratados com IL-18bp

Tratamento com IL-18bp confere proteção contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais tratados com CPT-11 (salina+CPT-11) revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais pré-tratados com IL-18bp (IL-18bp + CPT-11) não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais tratados somente com salina e que receberam CPT-11. ^ap<0,05 vs grupo tratado com salina não tratados com CPT-11; *p<0,05 vs grupo tratado com salina e que receberam CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(1-3) ^a
IL-18bp+CPT-11 60 mg/kg	1(0-2) ^b

Tabela 13 – Avaliação da diarreia em camundongos tratados com IL-18bp

Animais tratados com IL-18bp não desenvolvem diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais que receberam IL-18bp não foi capaz de promover aumentos significativos na mediana dos escores em comparação com animais que receberam injeção de apenas CPT-11. ^ap<0,05 vs salina; ^bp<0,05 vs CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

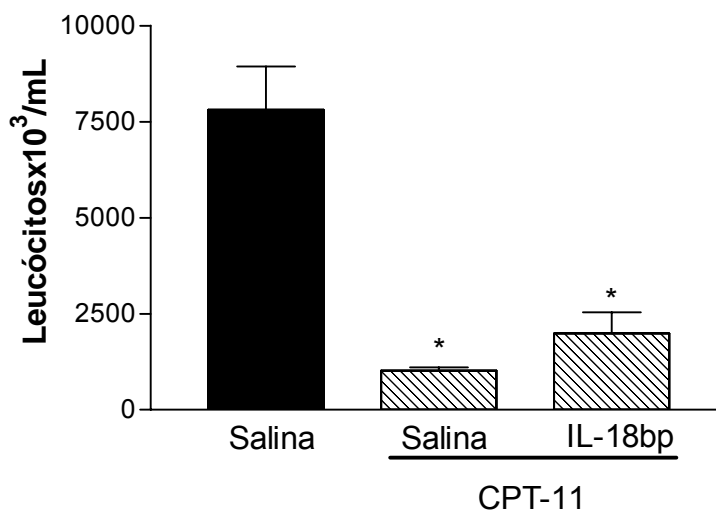


Figura 41 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com IL-18bp

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos tratados com IL-18bp. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais tratados com salina como em animais tratados com IL-18bp indicando a manutenção do efeito da droga sobre a redução do número de leucócitos circulantes a despeito do pré-tratamento aplicado. * $p < 0,05$ vs grupo salina não tratado com CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.7. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com a interleucina-33 (IL-33) sobre a mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 42**) e os escores histopatológicos (**tabela 14**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais BALB/c tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilos e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitelial de revestimento. Em animais tratados com interleucina-33, aos quais foi administrada salina, observou-se encurtamento de vilos sem comprometimento da arquitetura tecidual global ou perda da continuidade epitelial. Além disso, em animais que receberam IL-33 e CPT-11 visualizou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas e áreas de vacuolização, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes tratados apenas com salina e IL-33. A análise morfométrica (**figura 43**) revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.), e que receberam o veículo da IL-33 (H_2O_{dest}), induz uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilos/cripta quando comparados com animais tratados somente com salina. A **figura 43** apresenta também que animais tratados com IL-33 que receberam CPT-11 não desenvolveram alterações nesses parâmetros em comparação com animais tratados com IL-33 e que receberam salina ($p > 0,05$). Contudo, a IL-33 per si foi capaz de induzir uma significativa ($p < 0,05$) redução na razão vilos/cripta comparada com o grupo tratado com salina que não recebeu IL-33. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 44**, comparado com animais tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). Esse efeito não foi verificado nos animais tratados com IL-33, a despeito do tratamento com CPT-11, comparado com animais que receberam IL-33+salina ($p > 0,05$). O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 45**) e a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 15**) demonstraram que o CPT-11 induziu significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, em animais tratados com o veículo da IL-33 (H_2O_{dest}) quando comparado com o grupo tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, a

administração do CPT-11 a animais que receberam IL-33 não foi capaz de induzir alterações funcionais ou diarreia, quando comparado ao grupo que recebeu apenas IL-33 ($p>0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 46**) tanto em animais tratados com o veículo da IL-33 (H_2O_{dest}) como com IL-33, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p<0,05$).

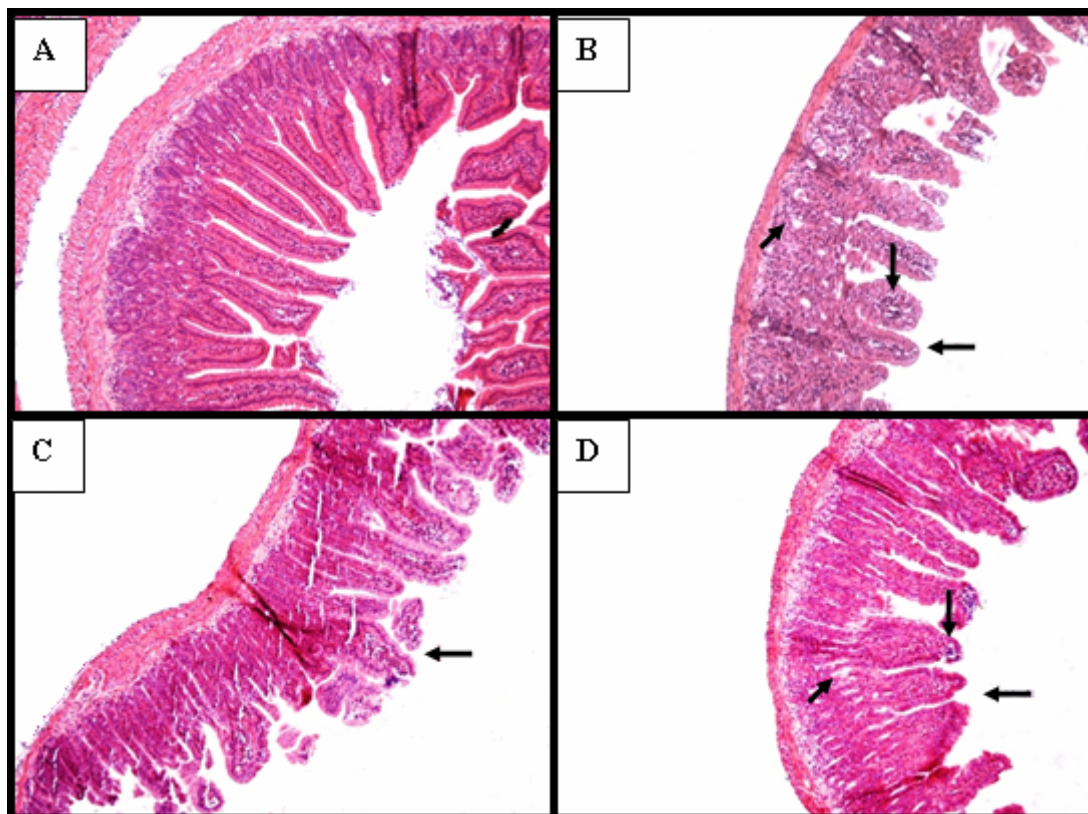


FIGURA 42 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com IL-33 e injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais que receberam CPT-11 (60 mg/kg) tratados ou não com IL-33, os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). Adicionalmente, os animais que receberam somente IL-33 apresentaram encurtamento de vilo com relativa perda de organização na arquitetura tecidual. **Painel A:** salina; **Painel B:** CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** IL-33 +salina; **Painel D:** IL-33 +CPT-11 60 mg/kg

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(1-4)*
IL-33	0(0-1)
IL-33 + CPT-11 60 mg/kg	1,5(1-3)

Tabela 14 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com IL-33

IL-33 previne o desenvolvimento de alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que a injeção de CPT-11 induz aumento dos escores histopatológicos quando comparados com animais tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais pré-tratados com IL-33 e que receberam CPT-11 não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais pré-tratados apenas com IL-33. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina, que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

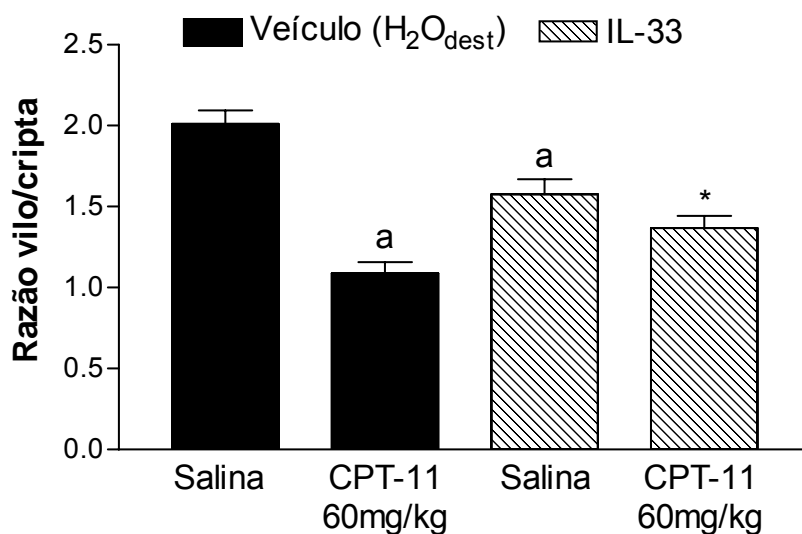


Figura 43 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilos/críptas em camundongos tratados com IL-33

IL-33 previne o desenvolvimento de alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que a injeção de CPT-11 induz uma redução na razão vilos/críptas quando comparados com animais tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais pré-tratados com IL-33 e que receberam CPT-11 não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais pré-tratados apenas com IL-33. Porém, em comparação com o grupo tratado com veículo e que receberam CPT-11, houve diferença estatística. ^ap<0,05 vs grupo tratado com salina, que não recebeu CPT-11; *p<0,05 vs grupo salina que recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

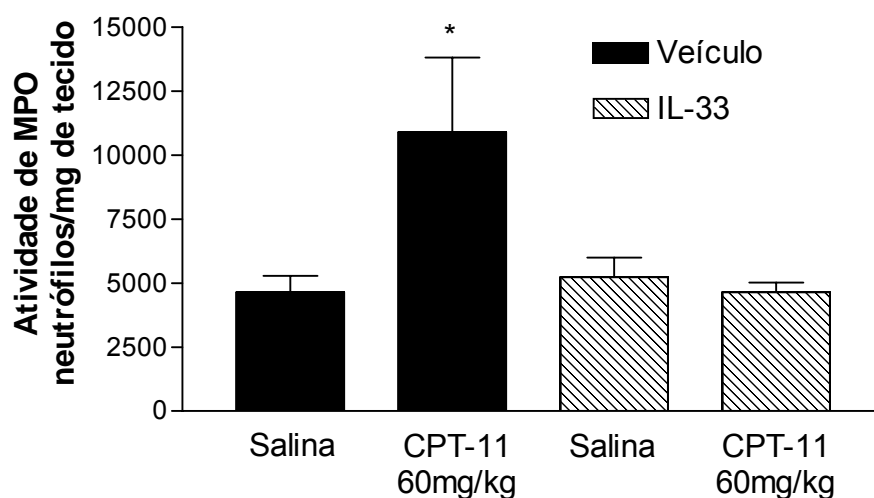


FIGURA 44 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com IL-33

Animais tratados com IL-33 não apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais tratados com o antineoplásico e que receberam o veículo da IL-33. Esse efeito não foi verificado nos animais tratados com IL-33. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

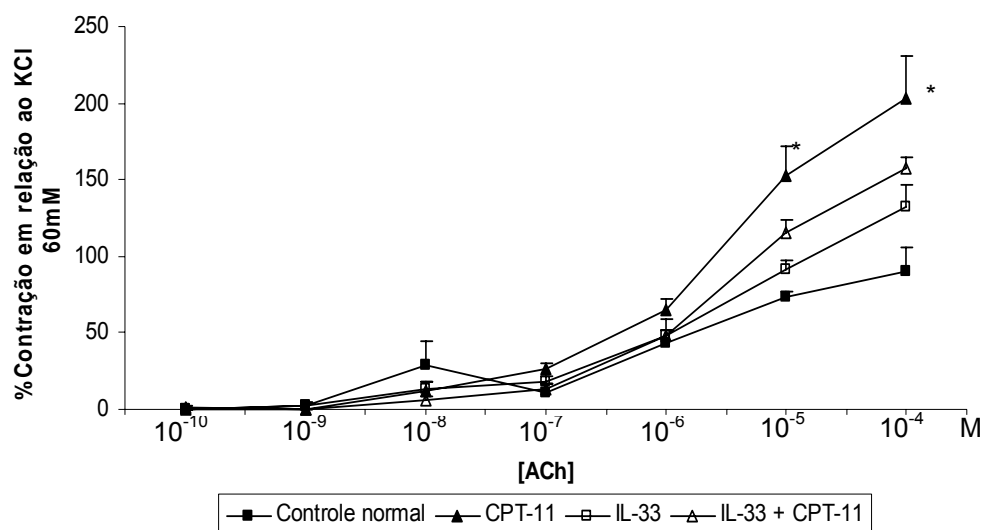


FIGURA 45 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos tratados com IL-33

Tratamento com IL-33 confere proteção contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais tratados com CPT-11 e veículo da IL-33 (salina, 100 μ L/animal, e.v.) revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais tratados com IL-33 não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais tratados somente com IL-33. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina e que receberam veículo da IL-33. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	2,5(2-3) ^a
IL-33	0(0-0)
IL-33+CPT-11 60 mg/kg	1(0-2)

Tabela 15 – Avaliação da diarreia em camundongos tratados com IL-33

Animais tratados com IL-33 não desenvolvem diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais tratados com IL-33 não foi capaz de promover aumentos significativos na mediana dos escores em comparação com animais tratados somente com IL-33. ^ap<0,05 vs grupo controle salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

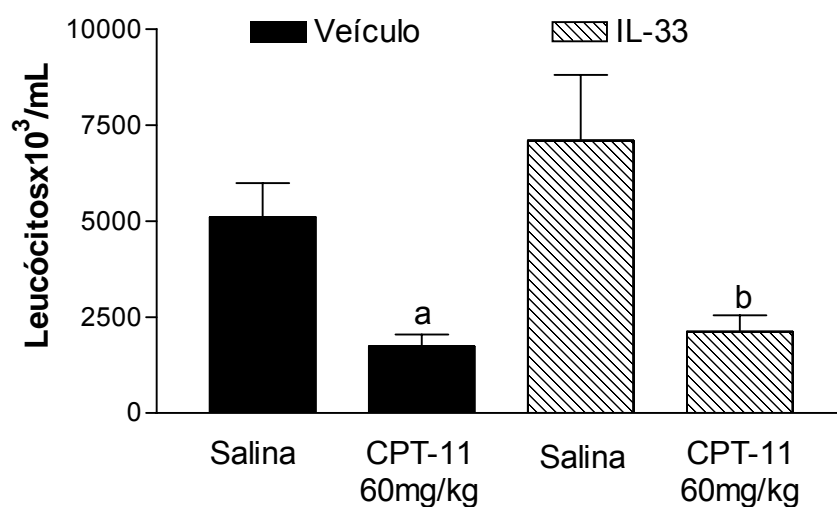


Figura 46 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com IL-33

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos tratados com IL-33. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais tratados com veículo da IL-33 (Salina, 100 μL /animal, e.v.) como em animais tratados com IL-33 indicando a manutenção do efeito da droga na redução do número de leucócitos circulantes. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina tratado com água destilada; ^b $p < 0,05$ vs grupo salina tratado com IL-33. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.8. avaliação da participação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) na mucosite intestinal induzida por CPT-11

4.8.1. Estudo em camundongos *knockout* para iNOS

As fotomicrografias (**figura 47**) e os escores histopatológicos (**tabela 16**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais WT (C57BL/6) tratados apenas com salina, induziu acentuada perda dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilo e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitélio de revestimento. Em animais *knockout* para óxido nítrico sintase induzida, iNOS^{-/-}, aos quais foi administrado CPT-11, observou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas e inflamatórias, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes *knockout* tratados apenas com salina. A análise morfométrica (**figura 48**) revelou que o tratamento dos animais selvagens (iNOS WT) com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) induziu uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilo/cripta quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A **figura 48** apresenta também que animais *knockout* para iNOS, iNOS^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolveram alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 49**, da marcação imunohistoquímica para óxido nítrico sintase induzida (iNOS), **figura 50**, e nos níveis plasmáticos de citocinas IL-1 β e KC (**tabela 17**) em animais selvagens (iNOS WT) comparados com animais selvagens tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). Esses efeitos não foram verificados nos animais iNOS^{-/-}, a despeito do tratamento com CPT-11 ($p > 0,05$), comparados com animais *knockout* que receberam somente salina. O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 51**) e a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 18**) e a análise da espessura da camada muscular (**figura 52**) demonstraram que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, e espessamento da camada muscular em animais iNOS WT quando comparado com o grupo selvagem tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, a

administração do CPT-11 a animais $iNOS^{-/-}$ não foi capaz de induzir alterações funcionais, diarréia ou espessamento da muscular, quando comparado ao grupo *knockout* que recebeu apenas salina ($p>0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 53**) tanto em animais selvagens ($iNOS$ WT) como em animais *knockout*, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p<0,05$).

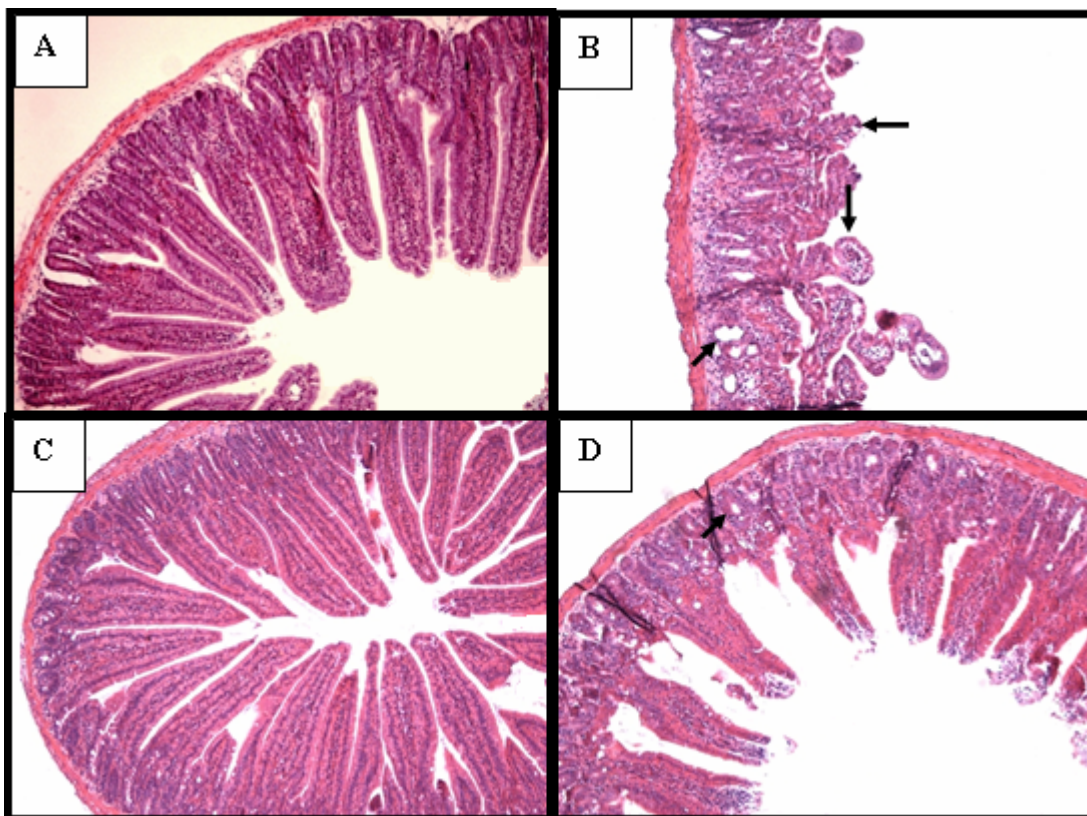


FIGURA 47 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos iNOS *knockout* injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais iNOS WT que receberam CPT-11 (60 mg/kg) os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). Em animais iNOS *knockout* (iNOS^{-/-}) há maior preservação da arquitetura tecidual com necrose focal de criptas (seta diagonal). **Painel A:** iNOS WT+salina; **Painel B:** iNOS WT+CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** iNOS^{-/-} +salina; **Painel D:** iNOS^{-/-} +CPT-11 60 mg/kg

Escores histopatológicos	
Grupo	Mediana (min-máx)
iNOS WT	0(0-0)
iNOS WT + CPT-11 60 mg/kg	3(2-4)*
iNOS ^{-/-}	0(0-0)
iNOS ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	2(1-3)

Tabela 16 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos iNOS^{-/-}

Camundongos iNOS^{-/-} não desenvolvem alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que o tratamento dos animais selvagens (C57BL/6, WT) com CPT-11 induz aumento dos escores histopatológicos quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais iNOS^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina ($p > 0,05$). * $p < 0,05$ vs grupo iNOS WT tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

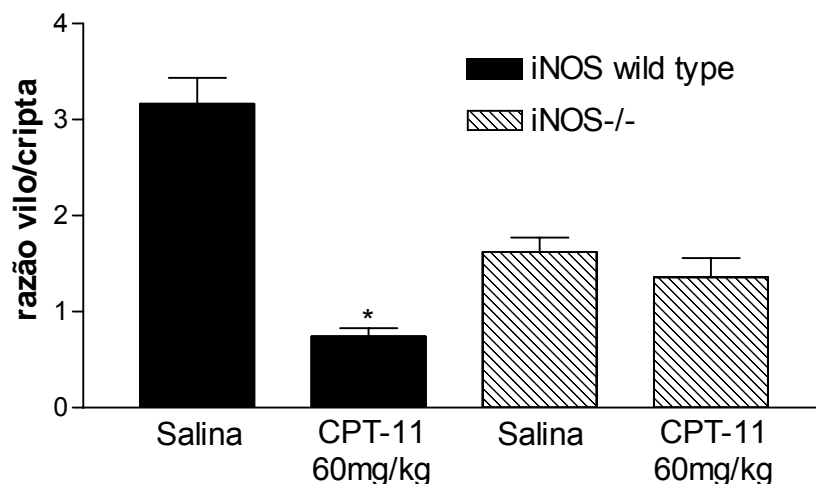


Figura 48 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos $iNOS^{-/-}$

Camundongos $iNOS^{-/-}$ não desenvolvem alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que o tratamento dos animais selvagens (C57BL/6, WT) com CPT-11 induz uma redução na razão vilo/cripta quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais $iNOS^{-/-}$, que receberam CPT-11, não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo $iNOS$ WT tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

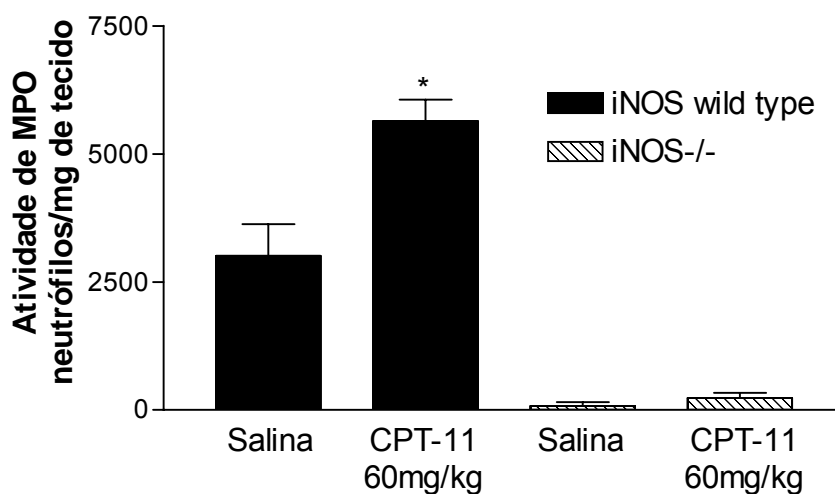


FIGURA 49 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos iNOS^{-/-}

Animais iNOS^{-/-} não apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais selvagens tratados com o antineoplásico (iNOS WT+CPT-11) comparados com animais selvagens tratados somente com salina (iNOS WT). Esse efeito não foi verificado nos animais iNOS^{-/-}, a despeito do tratamento com CPT-11. * $p < 0,05$ vs grupo iNOS selvagem (C57BL/6, WT) tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Níveis intestinais de citocinas (pg/mg proteína)		
Group	IL-1 β	KC
iNOS ^{+/+} + Salina	8,15 \pm 1.82	3,52 \pm 0,27
iNOS WT + CPT-11	537,50 \pm 106,30 ^a	452,30 \pm 42,94 ^a
iNOS ^{-/-} + CPT-11	277,50 \pm 46,66*	116,80 \pm 68,58*

TABELA 17 – Efeito do CPT-11 sobre os níveis duodenais de citocinas em camundongos iNOS^{-/-}

Animais iNOS^{-/-} não apresentam aumento nos níveis de citocinas no duodeno, a despeito do tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento dos níveis de citocinas IL-1 β e KC em animais selvagens tratados com o antineoplásico (iNOS WT+CPT-11) comparados com animais selvagens tratados somente com salina (iNOS WT+salina). Esse efeito foi atenuado nos animais iNOS^{-/-} tratados com CPT-11. ^ap<0,05 vs grupo iNOS selvagem (C57BL/6, WT) tratado com salina; *p<0,05 vs iNOS WT+CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

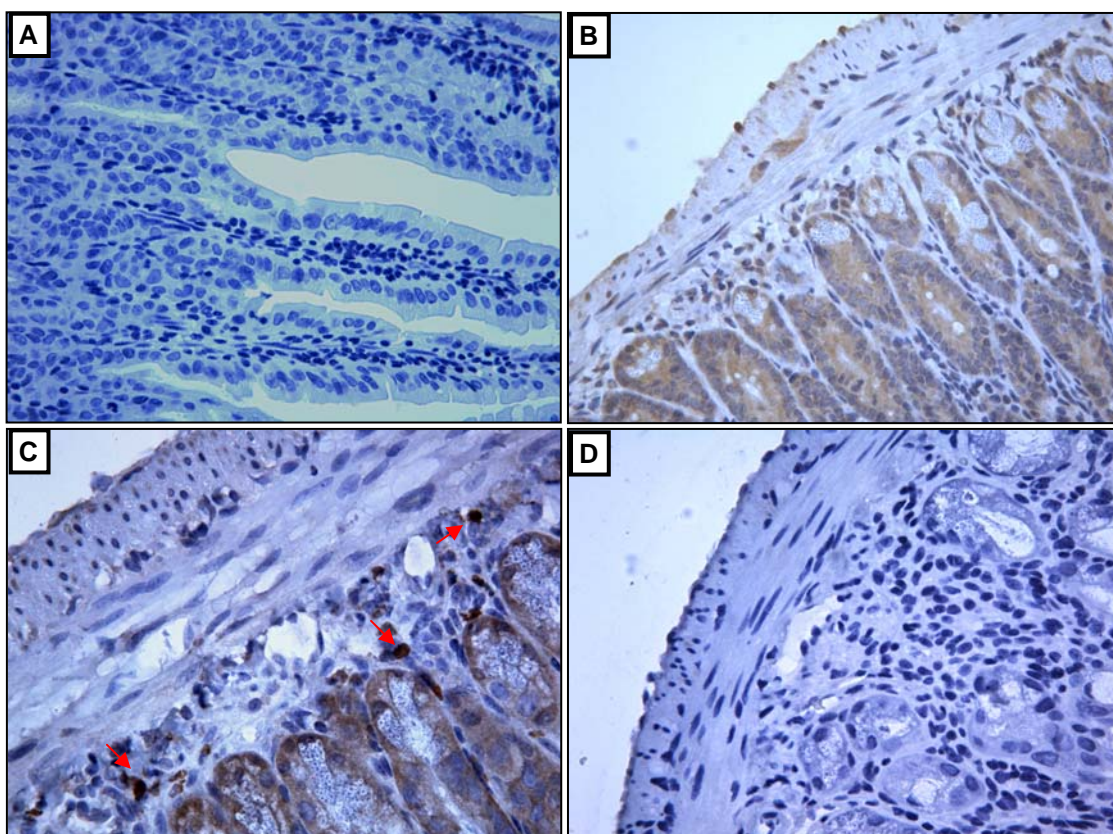


Figura 50 – Efeito do CPT-11 sobre a marcação imunohistoquímica para iNOS duodenal em camundongos $iNOS^{-/-}$

Animais tratados com CPT-11 apresentam forte marcação para iNOS. A análise imunohistoquímica revelou que o tratamento dos animais selvagens (C57BL/6, WT) com CPT-11 induz forte marcação para iNOS (painel C) quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina (painel B). A figura apresenta também que animais $iNOS^{-/-}$, que receberam CPT-11, não apresentam imunomarcação para iNOS (painel D). Painel A-Background

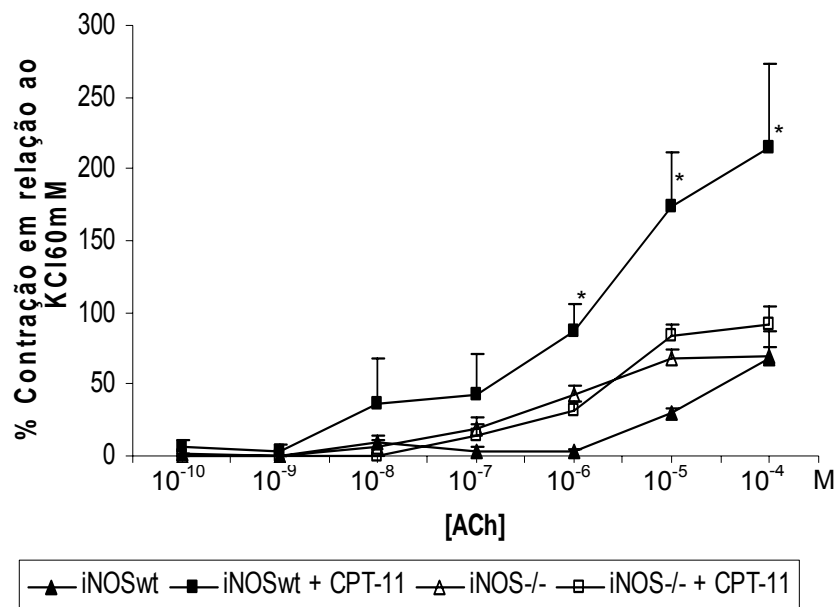


FIGURA 51 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos iNOS^{-/-}

Deleção para iNOS é fator protetor contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais selvagens tratados com CPT-11 (iNOS WT+CPT-11) revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina (iNOS WT). Contudo, a administração do CPT-11 aos animais iNOS^{-/-} não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais *knockout* para o mesmo gene tratados somente com salina (iNOS^{-/-}). *p<0,05 vs grupo iNOS selvagem (C57BL/6, WT) tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
iNOS WT	0(0-0)
iNOS WT + CPT-11 60 mg/kg	3(2-3)*
iNOS ^{-/-}	0(0-0)
iNOS ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	1(0-2)

Tabela 18 – Avaliação da diarreia em camundongos iNOS^{-/-}

Animais iNOS^{-/-} não desenvolvem diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais selvagens (C57BL/6, WT) tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais selvagens tratados apenas com salina (iNOS WT). Contudo, a administração do CPT-11 aos animais iNOS^{-/-} não foi capaz de promover aumentos significativos na mediana dos escores em comparação com animais *knockout* tratados somente com salina.* p<0,05 vs grupo iNOS WT. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

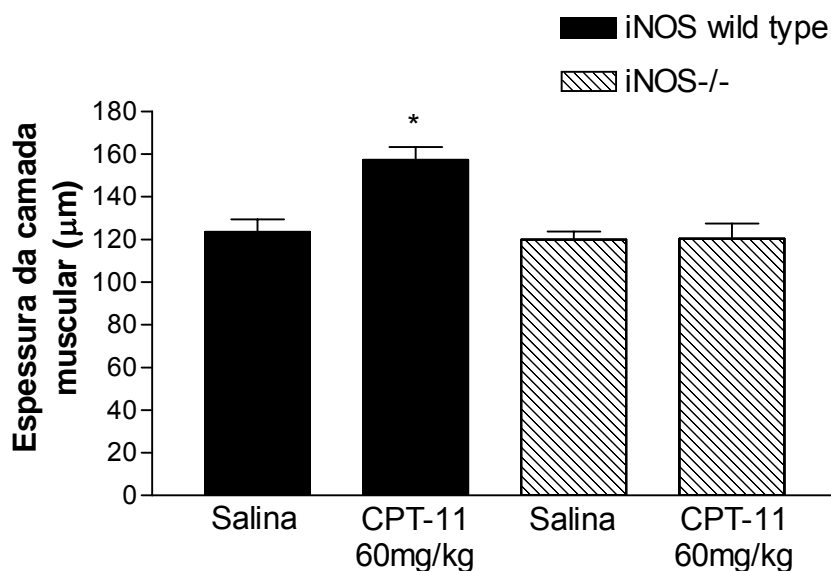


FIGURA 52 – Efeito do CPT-11 sobre a espessura da camada muscular duodenal de camundongos iNOS^{-/-}

Camundongos iNOS^{-/-} não desenvolvem espessamento da camada muscular do duodeno secundário à injeção CPT-11. A análise revelou que o tratamento dos animais selvagens (C57BL/6, WT) com CPT-11 induz um espessamento da camada muscular quando comparados com animais selvagens tratados somente com salina. A figura apresenta também que animais iNOS^{-/-}, que receberam CPT-11, não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais *knockout* tratados apenas com salina. * $p < 0,05$ vs grupo iNOS WT tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

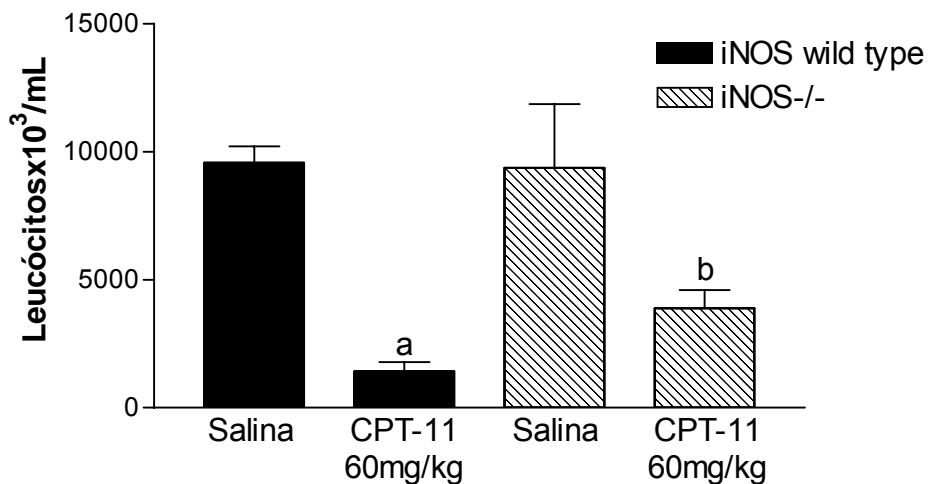


Figura 53 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos iNOS^{-/-}

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos iNOS^{-/-}. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais selvagens (C57BL/6, WT) como em animais *knockout* para iNOS indicando a manutenção do efeito da droga sobre a redução do número de leucócitos circulantes a despeito do tipo de animal. ^ap<0,05 vs grupo iNOS WT não tratado com CPT-11; ^bp<0,05 vs grupo iNOS^{-/-} não tratado com CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.8.2. Modulação farmacológica da atividade de iNOS com aminoguanidina

As fotomicrografias (**figura 54**) e os escores histopatológicos (**tabela 19**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais C57BL/6 tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta com intensa vacuolização de cripta e vilos e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade do epitélio de revestimento. Em animais tratados com aminoguanidina, aos quais foi administrado CPT-11, observou-se preservação da arquitetura de criptas e vilos, poucas células apoptóticas, bem como manutenção da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes controles tratados apenas com salina e aminoguanidina. A análise morfológica (**figura 55**) revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.), e que receberam o veículo da AMG (H_2O_{dest}), induz uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilos/cripta quando comparados com animais tratados somente com salina. A **figura 55** apresenta também que animais tratados com AMG que receberam CPT-11 não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais tratados com AMG e que receberam salina ($p > 0,05$). O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 56**, comparado com animais tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). Esse efeito não foi verificado nos animais tratados com AMG, a despeito do tratamento com CPT-11, comparado com animais que receberam AMG+salina ($p > 0,05$). O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 57**), a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 20**) e a análise da espessura da camada muscular (**figura 58**) demonstraram que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, e espessamento da muscular em animais tratados com o veículo da AMG (H_2O_{dest}) quando comparado com o grupo tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, a administração do CPT-11 a animais que receberam AMG não foi capaz de induzir alterações funcionais, diarreia ou espessamento da camada muscular duodenal, quando comparado ao grupo que recebeu apenas AMG ($p > 0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu

significativa leucopenia (**figura 59**) tanto em animais tratados com o veículo da AMG (H_2O_{dest}) como com AMG, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p < 0,05$).

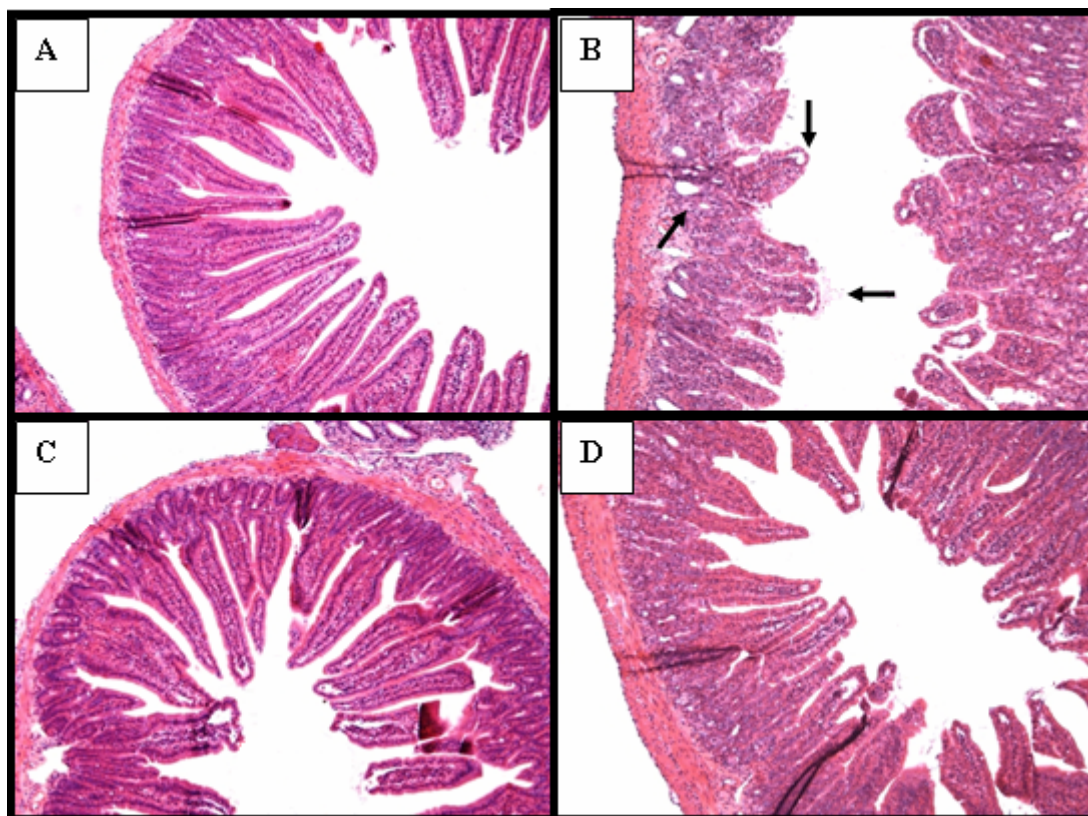


FIGURA 54 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com Aminoguanidina e injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais que receberam CPT-11 (60 mg/kg) não tratados com aminoguanidina, os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (seta vertical), necrose de criptas (seta diagonal). Em animais tratados com aminoguanidina, apesar da injeção de CPT-11, há preservação da arquitetura tecidual. **Painel A:** salina; **Painel B:** CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** Aminoguanidina; **Painel D:** Aminoguanidina +CPT-11 60 mg/kg

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(2-4)*
Aminoguanidina	0(0-0)
Aminoguanidina+ CPT-11 60 mg/kg	2(2-3)

Tabela 19 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com aminoguanidina

Aminoguanidina previne o desenvolvimento de alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A figura indica que o tratamento dos animais com CPT-11 induziu aumento dos escores histopatológicos quando comparados com animais tratados somente com salina e que receberam o veículo da aminoguanidina (H₂O destilada, 5 mL/kg, s.c). A figura apresenta também que animais tratados com aminoguanidina e CPT-11 não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais tratados apenas com salina e aminoguanidina ($p > 0,05$). * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina que não recebeu CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

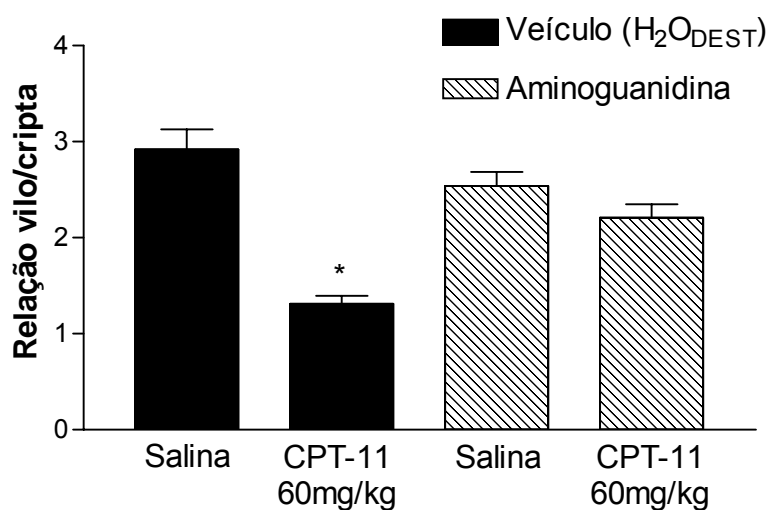


Figura 55 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com aminoguanidina

Aminoguanidina previne o desenvolvimento de alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A figura indica que o tratamento dos animais com CPT-11 induz uma redução na razão vilo/cripta quando comparados com animais tratados somente com salina e que receberam o veículo da aminoguanidina (H_2O destilada, 5 mL/kg, s.c). A figura apresenta também que animais tratados com aminoguanidina e CPT-11 não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais tratados apenas com salina e aminoguanidina. ^a $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina que não recebeu CPT-11; * $p < 0,05$ vs grupo tratado com CPT-11 que não recebeu aminoguanidina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

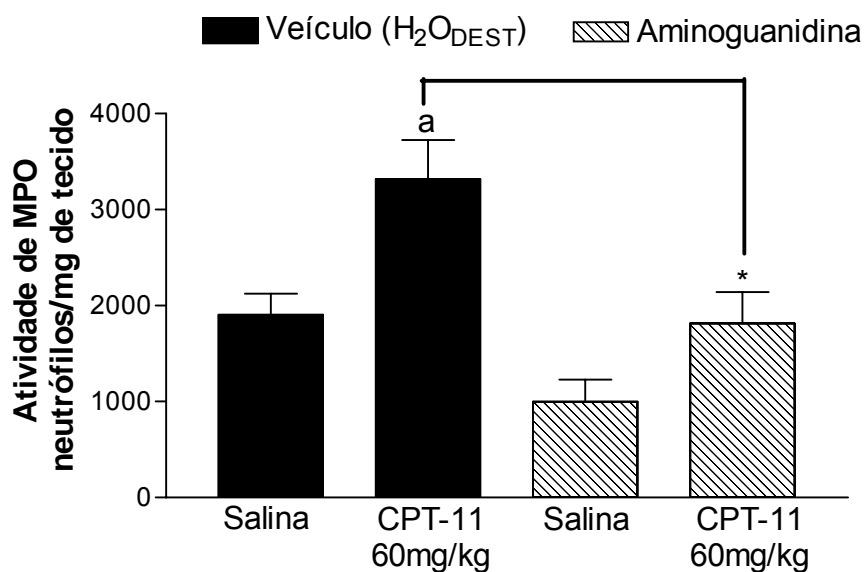


FIGURA 56 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com aminoguanidina

Animais tratados com aminoguanidina não apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais tratados com o antineoplásico e que receberam o veículo da aminoguanidina. Esse efeito não foi verificado nos animais tratados com aminoguanidina. ^a $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina que não recebeu CPT-11; * $p < 0,05$ vs grupo tratado com CPT-11 que não recebeu aminoguanidina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

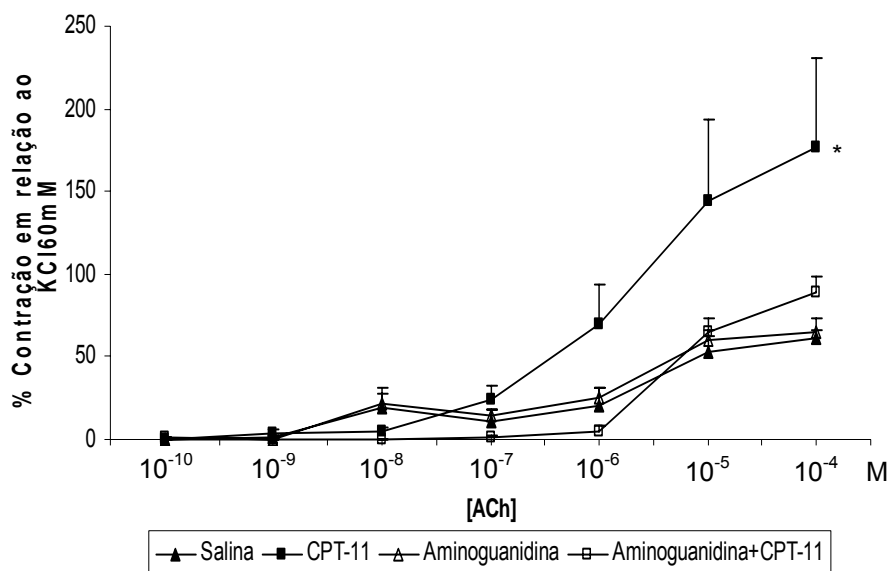


FIGURA 57 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos tratados com aminoguanidina

Tratamento com aminoguanidina confere proteção contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais tratados com CPT-11 e veículo revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais tratados com aminoguanidina não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais tratados somente com aminoguanidina. * $p < 0,05$ vs grupo tratado com salina e que receberam veículo da aminoguanidina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(3-3)*
Aminoguanidina	0(0-0)
Aminoguanidina+CPT-11 60 mg/kg	1(1-2)

Tabela 20 – Avaliação da diarreia em camundongos tratados com aminoguanidina

Animais tratados com aminoguanidina não desenvolvem diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais tratados com aminoguanidina não foi capaz de promover aumentos significativos na mediana dos escores em comparação com animais tratados somente com aminoguanidina. * $p < 0,05$ vs grupo controle normal. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

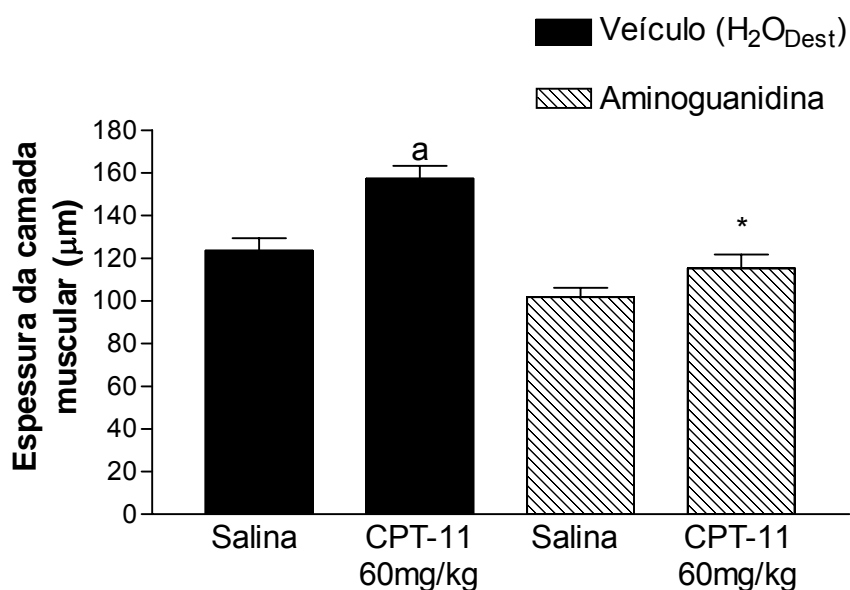


FIGURA 58 – Efeito do CPT-11 sobre a espessura da camada muscular duodenal de camundongos tratados com aminoguanidina

Aminoguanidina previne o desenvolvimento de espessamento da camada muscular do duodeno secundário à injeção CPT-11. A figura indica que o tratamento dos animais com CPT-11 induz espessamento da camada muscular quando comparados com animais tratados somente com salina e que receberam o veículo da aminoguanidina (H₂O destilada, 5 mL/kg, s.c). A figura apresenta também que animais tratados com aminoguanidina e CPT-11 não desenvolvem alterações nesses parâmetros em comparação com animais tratados apenas com salina e aminoguanidina. ^ap<0,05 vs grupo tratado com salina que não recebeu CPT-11; *p<0,05 vs grupo tratado com CPT-11 que não recebeu aminoguanidina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

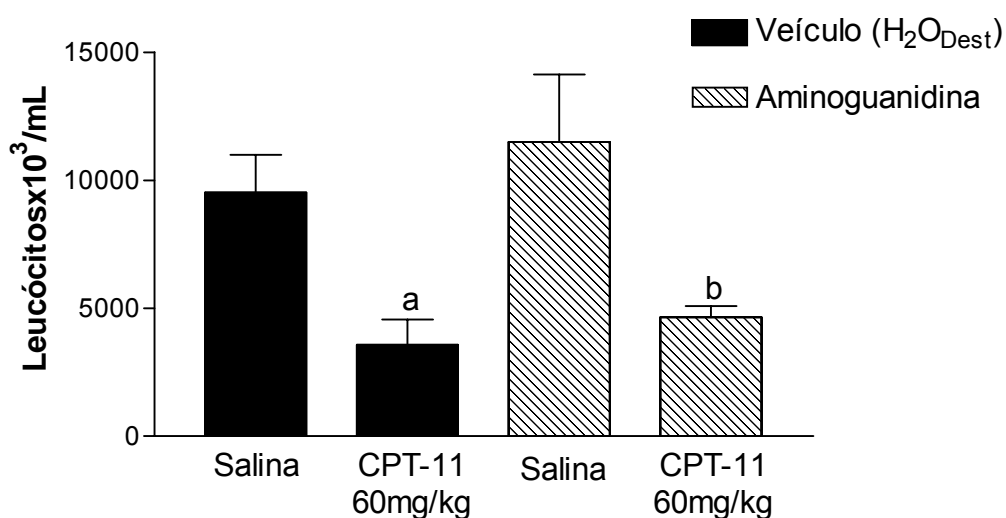


Figura 59 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com aminoguanidina

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos tratados com aminoguanidina. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais tratados com o veículo da aminoguanidina (H_2O destilada 5 mL/kg, s.c.) como em animais tratados com aminoguanidina indicando a manutenção do efeito da droga na redução do número de leucócitos circulantes. ^a $p < 0,05$ vs grupo tratado com veículo da aminoguanidina que não recebeu CPT-11; ^b $p < 0,05$ vs grupo tratado com aminoguanidina não tratado com CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.9. Avaliação da participação da 5-lipoxigenase (5-LOX) na mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 60**) e os escores histopatológicos (**tabela 21**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais 129Svev tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitélio de revestimento. Em animais *knockout* para 5-lipoxigenase, 5-LOX^{-/-}, aos quais foi administrado CPT-11, observou-se perda parcial, mas significativa da arquitetura de criptas e vilos, presença de células apoptóticas, e perda da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes *knockout* tratados apenas com salina. A análise morfométrica (**figura 61**) revelou que o tratamento dos animais selvagens (5-LOX WT) e de 5-LOX^{-/-} com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) induz uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilos/cripta quando comparados com os respectivos animais controle tratados somente com salina. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 62**, tanto em animais selvagens (5-LOX WT) como em animais 5-LOX^{-/-} comparados com os respectivos animais controle tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 63**) demonstrou que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais em animais 5-LOX WT quando comparado com o grupo selvagem tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, a administração do CPT-11 a animais 5-LOX^{-/-} não foi capaz de induzir alterações funcionais, quando comparado ao grupo *knockout* que recebeu apenas salina ($p > 0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 64**) tanto em animais selvagens (5-LOX WT) como em animais *knockout*, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p < 0,05$).

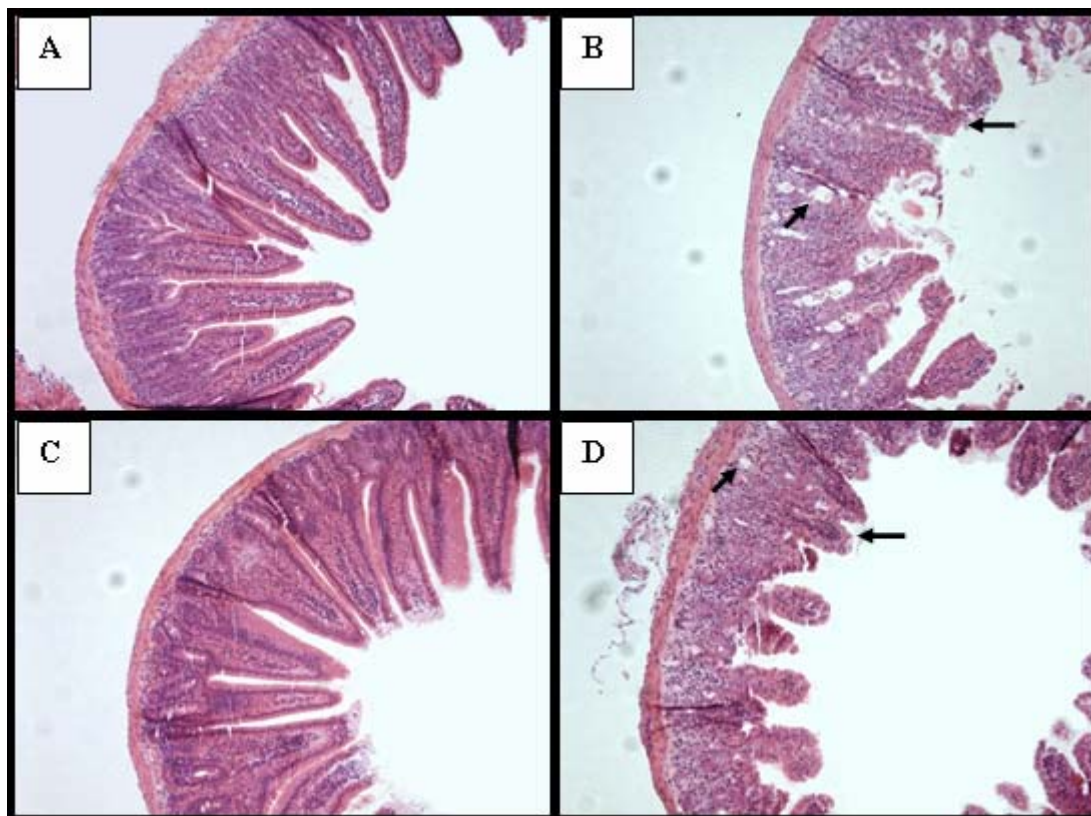


FIGURA 60 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos 5-lipoxigenase *knockout* injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais 5-LOX WT e 5-LOX *knockout* (5-LOX^{-/-}), ambos injetados com CPT-11 (60 mg/kg), os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas (seta diagonal). **Painel A:** 5-Lox WT+salina; **Painel B:** 5-Lox WT+CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** 5-Lox^{-/-}+salina; **Painel D:** 5-Lox^{-/-}+CPT-11 60 mg/kg.

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
5-LOX WT	0(0-0)
5-LOX WT + CPT-11 60 mg/kg	4(4-4)*
5-LOX ^{-/-}	0(0-0)
5-LOX ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	2,5(2-3)

Tabela 21 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos 5-LOX^{-/-}

Camundongos 5-Lox^{-/-} não desenvolvem alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que o tratamento dos animais selvagens (129Svev, 5-LOX WT) com CPT-11 induz aumento nos escores histopatológicos quando comparados, respectivamente, com animais selvagens tratados somente com salina. A figura mostra também que animais *knockout* para 5-LOX, que receberam CPT-11, não desenvolvem alterações histopatológicas significativas em comparação com animais 5-LOX^{-/-} que receberam apenas salina. *p<0,05 vs grupo 5-Lox WT tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

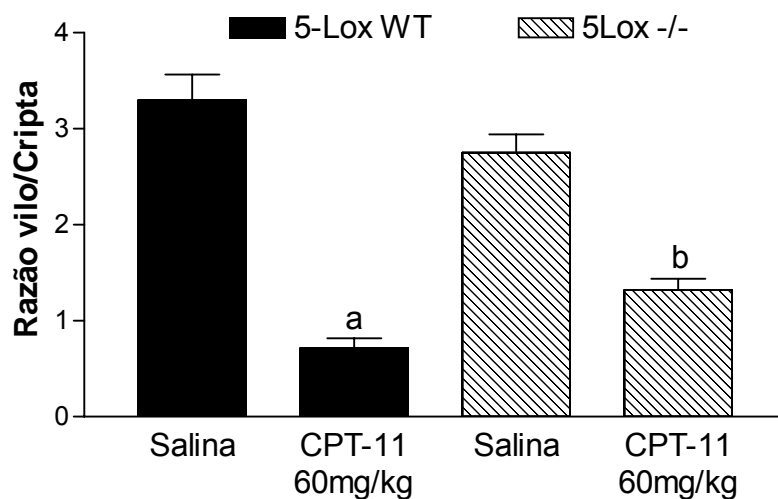


Figura 61 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos 5-Lox^{-/-}

Camundongos 5-Lox^{-/-} desenvolvem alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que o tratamento dos animais selvagens (129Svev, WT) e *knockout* para 5-Lox (5-Lox^{-/-}) com CPT-11 induz uma redução na razão vilo/cripta quando comparados, respectivamente, com animais selvagens e *knockout* tratados somente com salina. ^ap<0,05 vs grupo 5-Lox WT tratado com salina; ^bp<0,05 vs grupo 5-Lox^{-/-} tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

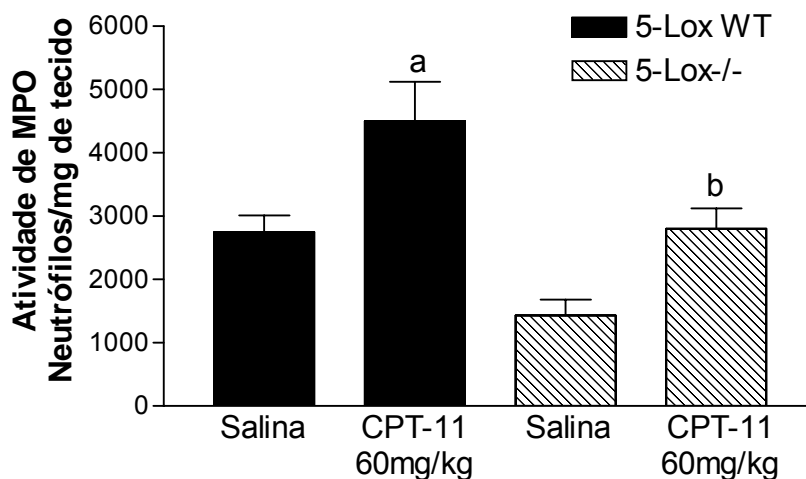


FIGURA 62 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos 5-Lox^{-/-}

Animais 5-Lox^{-/-} apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais selvagens tratados com o antineoplásico, 5-Lox WT+CPT-11 e 5-Lox^{-/-}+CPT-11, comparados com animais selvagens (129 Svej) e *knockout* (5-Lox^{-/-}), respectivamente, tratados somente com salina. ^ap<0,05 vs grupo 5-Lox WT tratado com salina; ^bp<0,05 vs grupo 5-Lox^{-/-} tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

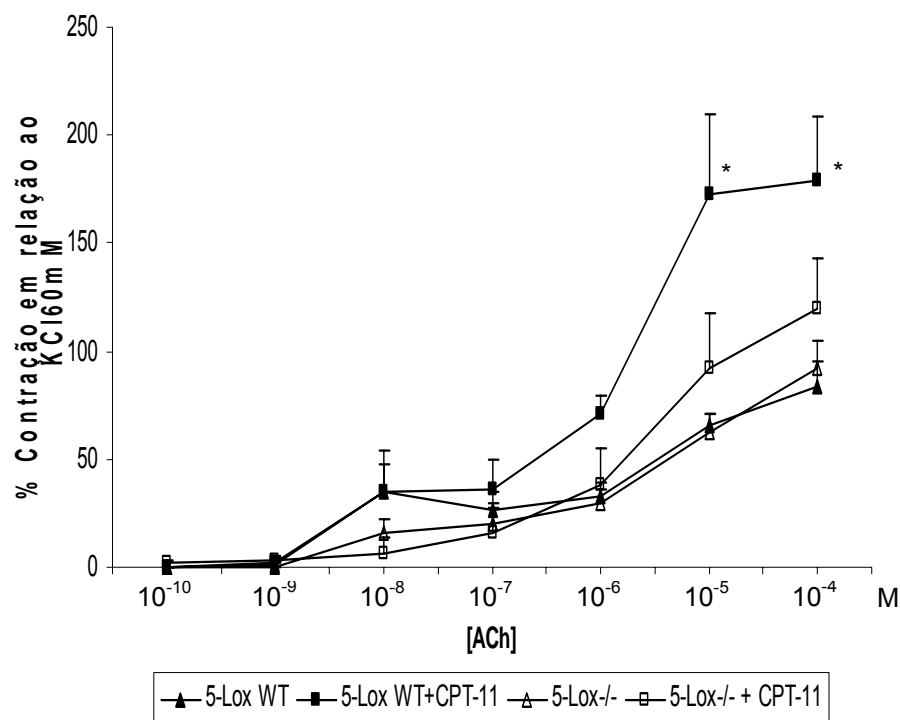


FIGURA 63 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos 5-Lox^{-/-}

Deleção para 5-Lox previne contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais selvagens tratados com CPT-11 (5-Lox WT+CPT-11) revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina (5-Lox WT). Contudo, a administração do CPT-11 aos animais 5-Lox^{-/-} não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais *knockout* para o mesmo gene tratados somente com salina (5-Lox^{-/-}). *p<0,05 vs grupo 5-Lox selvagem (129Svev, WT) tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

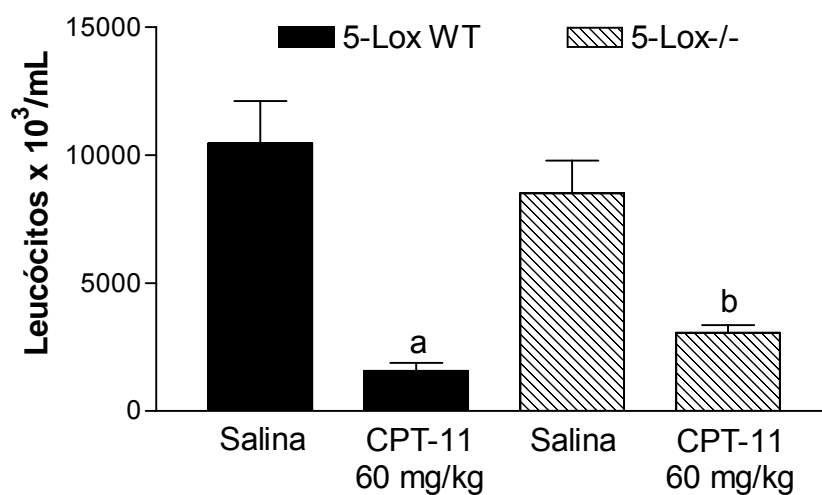


Figura 64 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos 5-Lox^{-/-}

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos 5-Lox^{-/-}. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais selvagens (129 Svej, WT) como em animais *knockout* para 5-Lox indicando a manutenção do efeito da droga sobre a redução do número de leucócitos circulantes a despeito do tipo de animal. ^ap<0,05 vs grupo 5-Lox Wild Type não tratado com CPT-11; ^bp<0,05 vs grupo 5-Lox^{-/-} não tratado com CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.10. Avaliação da participação do receptor para PAF (PAFr) na mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 65**) e os escores histopatológicos (**tabela 22**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia, em comparação com animais WT (BALB/c) tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitélio de revestimento. Em animais *knockout* para receptor de PAF, PAFr^{-/-}, aos quais foi administrado CPT-11, observou-se perda significativa da arquitetura de criptas e vilos, presença de células apoptóticas, e perda da continuidade do epitélio de revestimento quando comparado aos correspondentes *knockout* tratados apenas com salina. A análise morfométrica (**figura 66**) revelou que o tratamento dos animais selvagens (PAFr WT) e *knockout* para PAFr (PAFr^{-/-}) com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) induz uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilo/cripta quando comparados com os respectivos animais controle tratados somente com salina. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 67**, tanto em animais selvagens (PAFr WT) como em animais PAFr^{-/-} comparados com os respectivos animais controle tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 68**) demonstrou que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais em animais PAFr WT e em PAFr^{-/-} em comparação com os grupos controle tratado apenas com salina ($p < 0,05$), PAFr WT e PAFr^{-/-}, respectivamente. Adicionalmente, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 69**) tanto em animais selvagens (PAFr WT) como em animais *knockout* para esse receptor, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p < 0,05$).

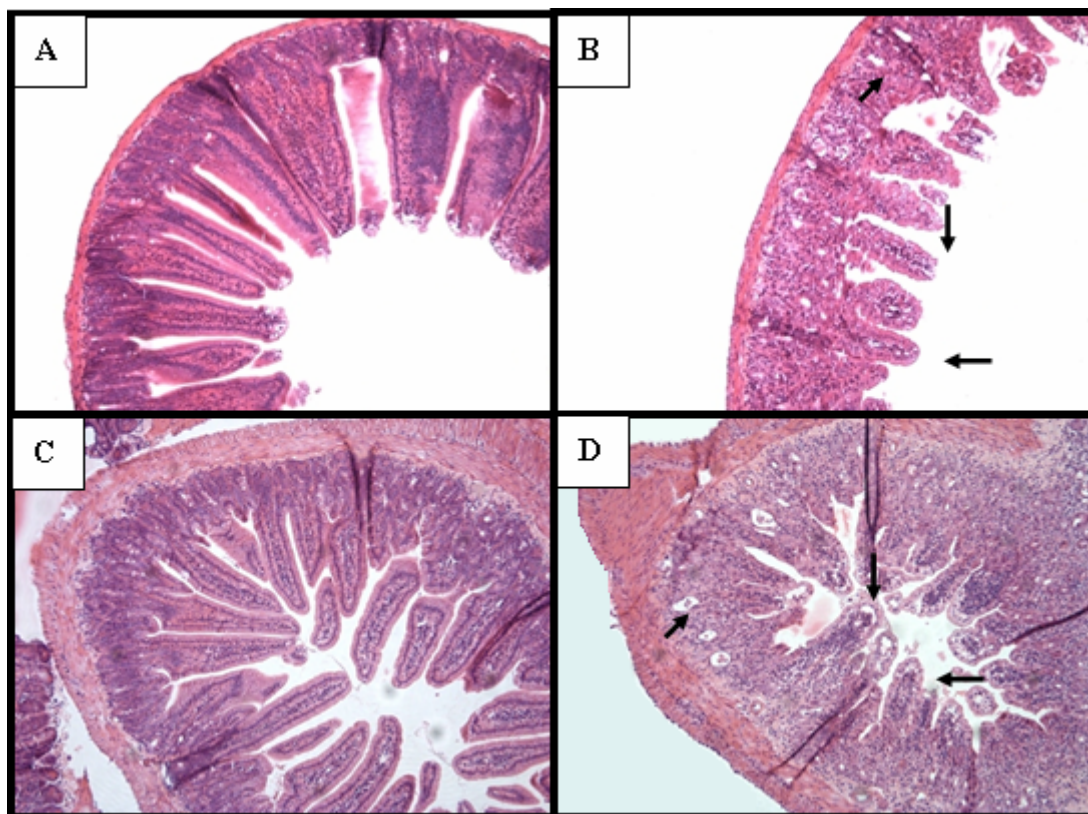


FIGURA 65 - Fotomicrografias do duodeno de camundongos *knockout* para receptor de PAF injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais PAFr WT e PAFr *knockout* (PAFr^{-/-}), ambos injetados com CPT-11 (60 mg/kg), os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (setas diagonais), necrose de criptas (seta diagonal). **Painel A:** PAFr WT+salina; **Painel B:** PAFr WT+CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** PAFr^{-/-} +salina; **Painel D:** PAFr^{-/-} +CPT-11 60 mg/kg.

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
PAFr WT	0(0-0)
PAFr WT + CPT-11 60 mg/kg	3(1-4) ^a
PAFr ^{-/-}	0(0-0)
PAFr ^{-/-} + CPT-11 60 mg/kg	3(3-4) ^b

Tabela 22 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos PAFr^{-/-}

Camundongos PAFr^{-/-} desenvolvem alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que o tratamento dos animais selvagens (BALB/c, WT) e *knockout* para PAFr (PAFr^{-/-}) com CPT-11 induz aumento nos escores histopatológicos quando comparados, respectivamente, com animais selvagens e *knockout* tratados somente com salina. ^ap<0,05 vs grupo PAFr WT tratado com salina; ^bp<0,05 vs grupo PAFr^{-/-} tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

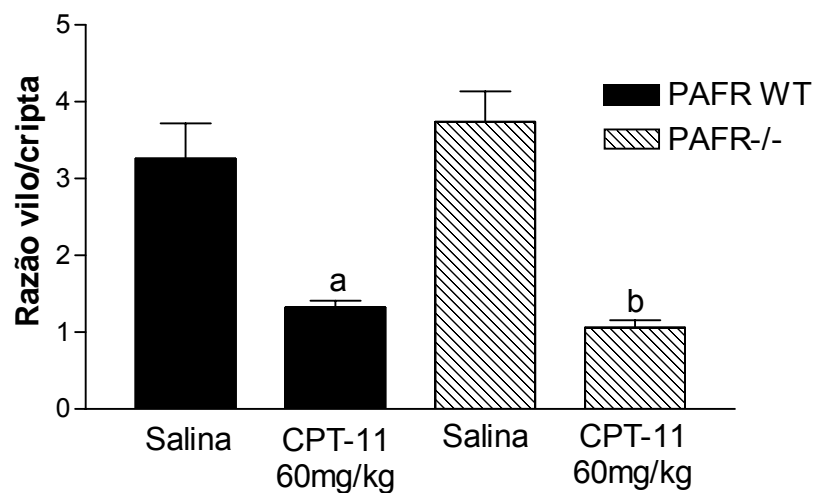


Figura 66 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos PAFR^{-/-}

Camundongos PAFR^{-/-} desenvolvem alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que o tratamento dos animais selvagens (BALB/c, WT) e *knockout* para PAFR (PAFR^{-/-}) com CPT-11 induz uma redução na razão vilo/cripta quando comparados, respectivamente, com animais selvagens e *knockout* tratados somente com salina. ^ap<0,05 vs grupo PAFR WT tratado com salina; ^bp<0,05 vs grupo PAFR^{-/-} tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

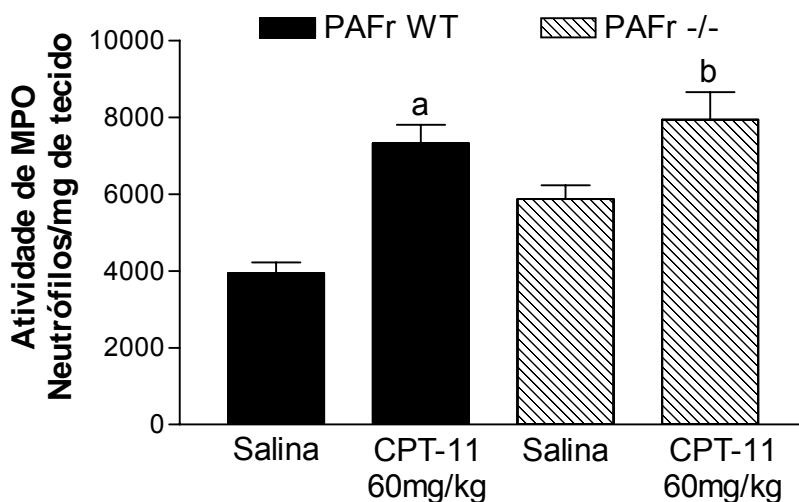


FIGURA 67 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos PAFr^{-/-}

Animais PAFr^{-/-} apresentam aumento da atividade de MPO no duodeno por tratamento com CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais selvagens tratados com o antineoplásico, PAFr WT+CPT-11 e PAFr^{-/-}+CPT-11, comparados com animais selvagens (BALB/c) e *knockout* (PAFr^{-/-}), respectivamente, tratados somente com salina. ^ap<0,05 vs grupo PAFr WT tratado com salina; ^bp<0,05 vs grupo PAFr^{-/-} tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

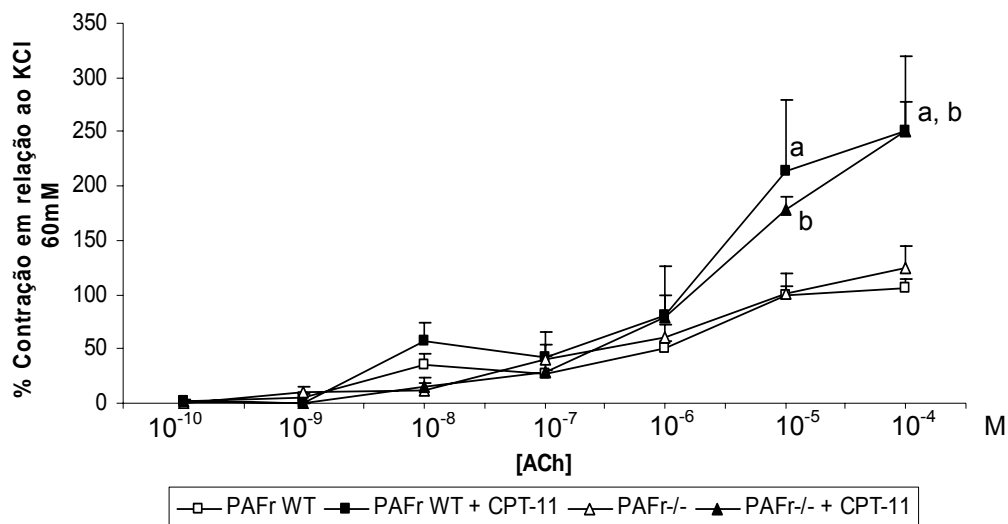


FIGURA 68 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos PAFr^{-/-}

Deleção para PAFr não previne contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais selvagens e *knockout* tratados com CPT-11 (PAFr WT+CPT-11 e PAFr^{-/-}+CPT-11, respectivamente) revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparados aos animais tratados apenas com salina (PAFr WT e PAFr^{-/-}). ^ap<0,05 vs grupo PAFr selvagem (BALB/c, WT) tratado com salina; ^bp<0,05 vs grupo PAFr^{-/-} tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

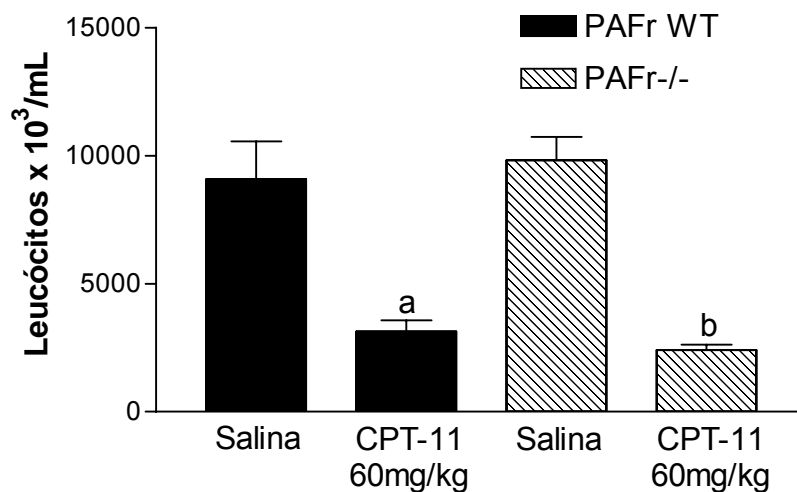


Figura 69 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos PAFr^{-/-}

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos PAFr^{-/-}. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais selvagens (BALB/c, WT) como em animais *knockout* para PAFr indicando a manutenção do efeito da droga sobre a redução do número de leucócitos circulantes a despeito do tipo de animal. ^ap<0,05 vs grupo PAFr WT não tratado com CPT-11; ^bp<0,05 vs grupo PAFr^{-/-} não tratado com CPT-11. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

4.11. Avaliação do efeito do tratamento de camundongos com cloridrato de loperamida (LOP) sobre a mucosite induzida por CPT-11

As fotomicrografias (**figura 70**) e os escores histopatológicos (**tabela 23**) indicam que o CPT-11 na dose de 60 mg/kg/dia administrado a animais C57BL/6 tratados ou não com loperamida, em comparação com animais tratados apenas com salina, induziu acentuado achatamento dos vilos intestinais, necrose e apoptose de células da cripta e infiltração inflamatória na mucosa. Adicionalmente, houve perda significativa da continuidade epitélio de revestimento. A análise morfométrica (**figura 71**) revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.), e que receberam o veículo da Lop (H_2O_{dest}) ou Lop, induz uma significativa redução ($p < 0,05$) na razão vilo/cripta quando comparados com os respectivos animais controle tratados somente com salina. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) sobre o duodeno foi detectado pelo aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de MPO, como apresentado na **figura 72**, tanto em animais tratados com o veículo da Lop com nos que receberam Lop, comparados com os respectivos grupos controle tratados somente com salina (5 mL/kg, i.p.). O estudo de contratilidade *in vitro* (**figura 73**) e a análise do grau de diarreia apresentado (**tabela 24**) demonstraram que o CPT-11 induz significativas alterações funcionais, que levam à diarreia, em animais tratados com o veículo da Lop (H_2O_{dest}) quando comparado com o grupo tratado apenas com salina ($p < 0,05$). Porém, a administração do CPT-11 a animais que receberam Lop não foi capaz de induzir alterações funcionais ou diarreia, quando comparado ao grupo que recebeu apenas Lop ($p > 0,05$). Entretanto, o CPT-11 induziu significativa leucopenia (**figura 74**) tanto em animais tratados com o veículo da Lop (H_2O_{dest}) como com Lop, comparados com os respectivos controles tratados apenas com salina ($p < 0,05$).

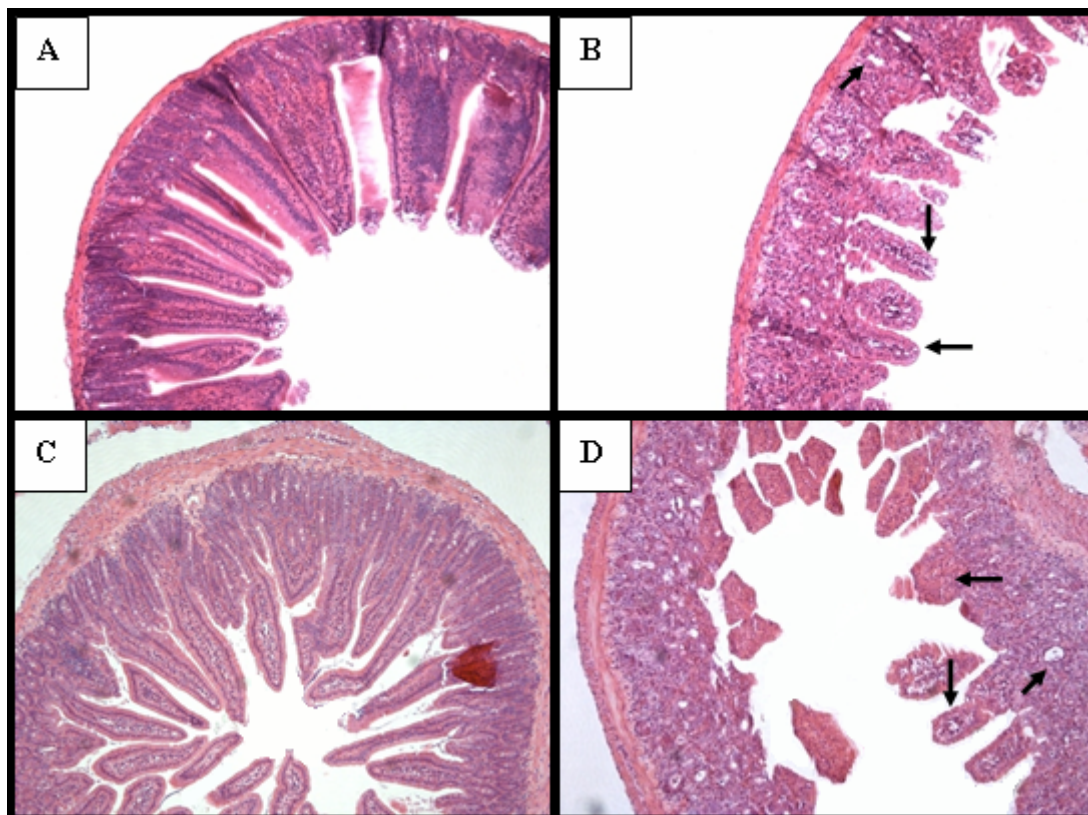


FIGURA 70 – Fotomicrografias do duodeno de camundongos tratados com loperamida e injetados com salina 0,9% ou CPT-11.

Os animais receberam salina ou CPT-11 (60 mg/kg, i.p.) por quatro dias consecutivos e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (100x). Na mucosa dos animais injetados com CPT-11 (60 mg/kg), tratados ou não com loperamida, os vilos estão encurtados (setas horizontais), há achatamento e vacuolização de enterócitos (setas diagonais), necrose de criptas (seta diagonal). **Painel A:** salina; **Painel B:** CPT-11 60 mg/kg; **Painel C:** Loperamida +salina; **Painel D:** Loperamida +CPT-11 60 mg/kg.

Escore histopatológico	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(1-4) ^a
Loperamida	0(0-0)
Loperamida + CPT-11 60 mg/kg	2,5 (2-4) ^b

Tabela 23 – Efeito do CPT-11 sobre os aspectos microscópicos duodenais em camundongos tratados com loperamida

Tratamento com Loperamida não previne o desenvolvimento de alterações histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.), e que receberam o veículo da Lop (H₂O_{dest}) ou Lop, induz significativo aumento nos escores histopatológicos quando comparados com o grupo controle tratado somente com salina. ^ap<0,05 vs grupo salina tratado com água destilada (5 mL/kg, s.c.); ^bp<0,05 vs grupo salina tratado com loperamida. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

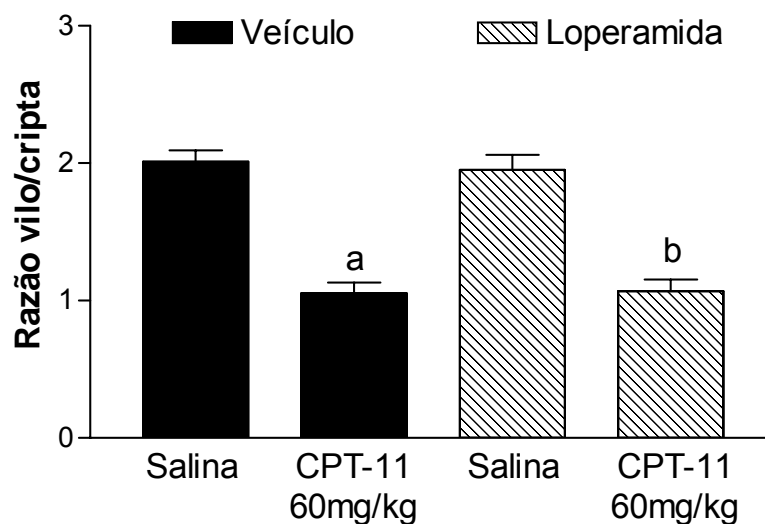


Figura 71 – Efeito do CPT-11 sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com Loperamida

Tratamento com Loperamida não previne o desenvolvimento de alterações morfológicas histopatológicas no duodeno secundárias à injeção CPT-11. A análise morfológica revelou que o tratamento dos animais com CPT-11 (60 mg/kg, i.p.), e que receberam o veículo da Lop (H_2O_{dest}) ou Lop, induz uma significativa redução na razão vilo/cripta quando comparados com os respectivos animais controle tratados somente com salina. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina tratado com água destilada (5 mL/kg, s.c.); ^b $p < 0,05$ vs grupo salina tratado com loperamida. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

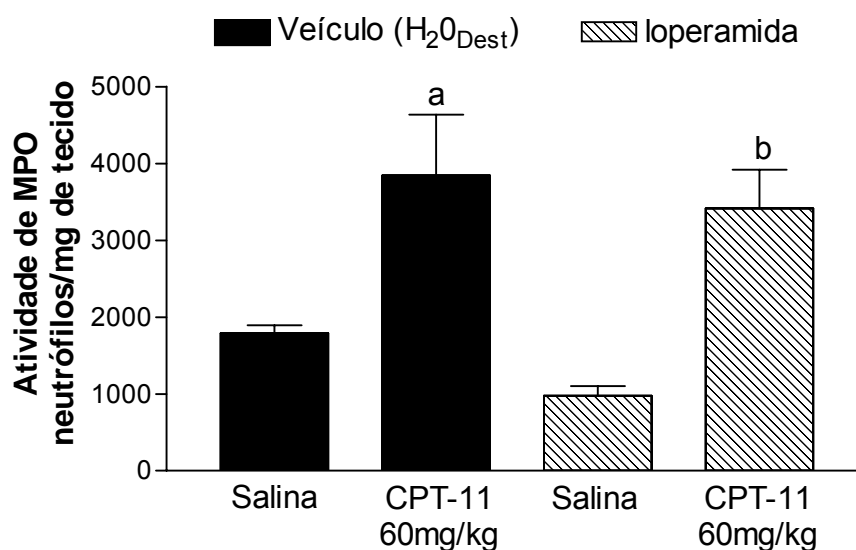


FIGURA 72 – Efeito do CPT-11 sobre a atividade de mieloperoxidase em duodeno de camundongos tratados com loperamida

Tratamento com loperamida não previne aumento da atividade de MPO no duodeno na mucosite por CPT-11. O efeito pro-inflamatório do CPT-11 no duodeno foi detectado pelo aumento da atividade de MPO em animais tratados com o antineoplásico comparados com animais tratados somente com salina, tanto em animais que receberam veículo ou loperamida. ^ap<0,05 vs grupo salina tratado com água destilada (5 mL/kg, s.c.); ^bp<0,05 vs grupo salina tratado com loperamida. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

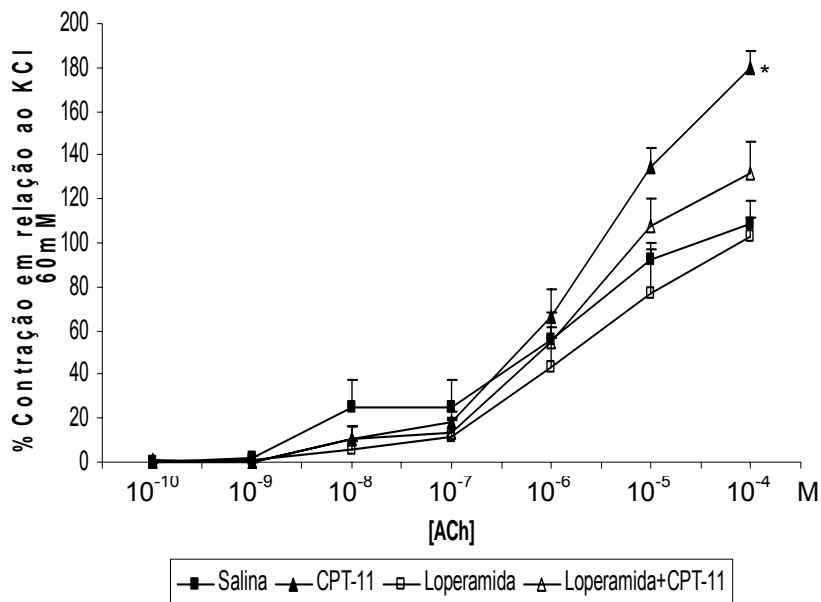


FIGURA 73 – Efeito do CPT-11 sobre a contratilidade duodenal *in vitro* em camundongos loperamida

Loperamida previne contra alterações funcionais de duodeno induzidas por CPT-11. O estudo funcional do duodeno coletado de animais tratados com CPT-11 revelou um aumento da responsividade do tecido à Acetilcolina (ACh) quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais tratados com loperamida não foi capaz de promover alterações funcionais em comparação com animais que receberam somente loperamida. * $p < 0,05$ vs grupo controle tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

Escore para diarreia	
Grupo	Mediana (min-máx)
Salina	0(0-0)
CPT-11 60 mg/kg	3(2-3)*
Loperamida	0(0-0)
Loperamida + CPT-11 60 mg/kg	1(0-2)

Tabela 24 – Avaliação da diarreia em camundongos tratados com loperamida

Animais tratados com loperamida não desenvolvem diarreia induzida por CPT-11. O estudo revela que animais tratados com CPT-11 apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado aos animais tratados apenas com salina. Contudo, a administração do CPT-11 aos animais tratados com loperamida não foi capaz de promover aumentos significativos na mediana dos escores em comparação com animais tratados somente com loperamida. * $p < 0,05$ vs grupo controle salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

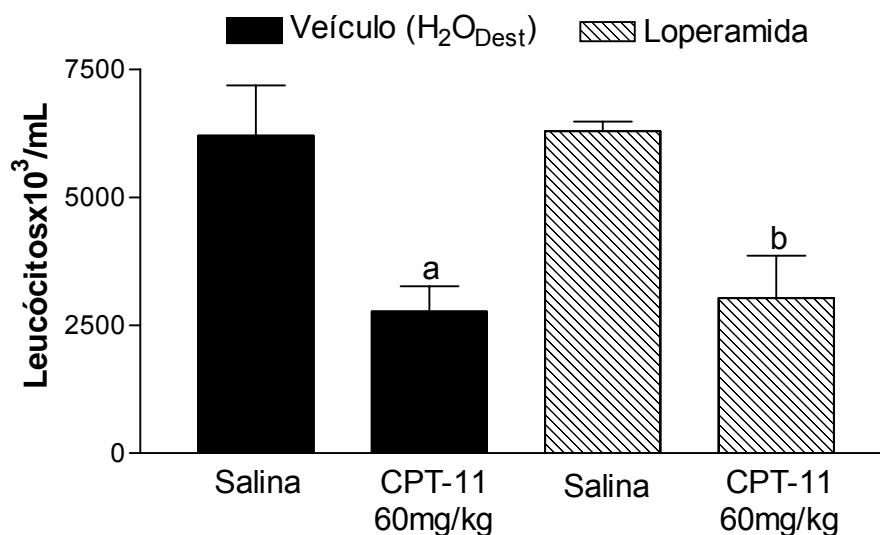


Figura 74 – Efeito do CPT-11 sobre a contagem de leucócitos sanguíneos em camundongos tratados com loperamida

Tratamento com CPT-11 induz leucopenia em camundongos tratados com loperamida. A figura apresenta o efeito do CPT-11 em induzir leucopenia tanto em animais tratados com veículo da loperamida (água destilada, 5 mL/kg, s.c.) como em animais tratados com loperamida indicando a manutenção do efeito da droga na redução do número de leucócitos circulantes. ^a $p < 0,05$ vs grupo salina tratado com água destilada; ^b $p < 0,05$ vs grupo salina tratado com loperamida. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

5. DISCUSSÃO

A mucosite do trato alimentar, que engloba todo o tubo digestivo, está relacionada com a toxicidade associada a muitos regimes quimioterápicos padrão comumente utilizados no tratamento do câncer, sendo mais proeminente no intestino delgado. É também observada como reflexo da radioterapia em muitas partes do trato gastrintestinal (Sonis et al., 2004).

As causas de diarreia diretamente relacionadas com o tratamento do câncer podem envolver redução da superfície absorptiva do intestino, aumento de motilidade, mecanismos secretores de eletrólitos e fluidos, redução da atividade enzimática intestinal e aumento da colonização da parede intestinal por agentes infecciosos (Engelking et al., 1998). Contudo, a ação do sistema imune sobre esses agentes infecciosos pode ser determinante para o desenvolvimento de diarreia.

Em um estudo recente do nosso grupo, Melo e colaboradores (2007) demonstraram que o CPT-11 causa significativo dano à mucosa intestinal, levando ao desenvolvimento de mucosite, caracterizada por áreas desnudas, achatamento de vilos, vacuolização epitelial, criptas necróticas e intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria, ao lado de grande aumento dos níveis locais de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e KC. Essa observação despertou um interesse em se investigar o mecanismo envolvido na indução da lesão intestinal pelo antineoplásico CPT-11.

Inicialmente, foram realizados experimentos na tentativa de se estabelecer a melhor dose de CPT-11 a ser utilizada nos estudos mecanísticos subsequentes. O método desenvolvido baseou-se no modelo proposto por Ikuno e colaboradores (1995), que utilizou 100 mg/kg de CPT-11 durante quatro dias. Desta forma, optou-se por avaliar morfofuncionalmente a mucosite intestinal em camundongos Swiss e C57BL/6. A escolha dessas linhagens baseou-se nos seguintes pontos: a) animais Swiss foram utilizados em experimentos anteriores (Melo et al., 2008); b) devido à semelhança fisiológica e imunológica desses camundongos com humanos (Wade, Daly, 2005); e c)

considerando as observações encontradas, objetivamos comparar o desenvolvimento da mucosite intestinal em Swiss com a de camundongos C57BL/6, uma vez que essa última é a espécie (*background*) geralmente utilizada para desenvolvimento de animais *knockout*.

Um importante método para o estudo dos efeitos funcionais de produtos de genes específicos *in vivo* é a criação de camundongos *knockout* para determinado gene, nos quais uma ruptura direcionada é utilizada para inibir a função de um gene em particular. Essa técnica tem sido utilizada para análise de muitos fenômenos biológicos, incluindo a maturação, ativação e tolerância de linfócitos. Essa técnica se baseia no fenômeno da recombinação homóloga. Se um gene exógeno é inserido em uma célula, ele pode se integrar ao acaso ao genoma celular. Contudo, se o gene contém seqüências que são homólogas às de um gene endógeno, ele irá se recombinar preferencialmente com as seqüências endógenas, realizando a substituição (Abbas, Lichtman, 2005a).

Como apresentado nos resultados, foram detectadas alterações funcionais, que estavam intimamente relacionadas com o grau de lesão verificado na análise histopatológica, além de estarem associados aos eventos de diarreia observados. Contudo, no estudo de Melo e colaboradores (2007), as análises foram realizadas no sétimo dia após a primeira dose de CPT-11. Em nosso trabalho, os sacrifícios foram feitos no quinto dia devido à mortalidade elevada verificada do sexto para o sétimo dia experimentais (dados não apresentados). Essa diferença entre a taxa de mortalidade entre os estudos possivelmente se estabeleceu, pois foram utilizadas cepas diferentes de animais, o que implica diferença de sensibilidade ao antineoplásico.

Recentemente, foi publicado por nosso grupo um estudo funcional em ratos com mucosite intestinal induzida pelo antineoplásico 5-fluorouracil (Soares et al., 2008). Esta representou a primeira abordagem experimental das variações funcionais intestinais decorrentes de um tratamento com quimioterápico, a despeito dos inúmeros estudos *in vitro* envolvendo o conhecimento da fisiologia gastrintestinal ou a influência de processos patológicos outros sobre essa porção do organismo (Nasser et al., 2006;

Aerssens et al., 2007; Burns, 2007; Döring et al., 2007; Mulè et al., 2007; Zizzo et al., 2007; Sartor 2008)

As reações imunes são mais frequentemente denominadas por uma das duas maiores populações de linfócitos T, Th1 ou Th2. Apesar do vasto conhecimento relacionado a essa dicotomia da resposta imune em processos patológicos, um novo tipo de células T, células T regulatórias (Tr), com função imunossupressiva e com perfil distinto de citocinas daquelas secretadas por células Th1 e Th2 foi descrito (McGuirk; Mills, 2002). As proporções relativas dessas subpopulações, induzidas durante uma resposta imune, são os principais determinantes das funções protetoras e das conseqüências patológicas da resposta. Uma vez que uma resposta imune se desenvolve ao longo de uma via, ela se torna cada vez mais polarizada naquela direção (Abbas, Lichtman, 2005b).

Muitas abordagens foram feitas relacionando a inibição da atividade pró-inflamatória das respostas Th1, tal como o tratamento de pacientes com doença de Crohn utilizando anticorpo quimérico contra TNF- α (Sandborn e Hanauer, 1999; Flamant e Bourreille, 2007) ou a administração de anticorpos contra IL-12 em modelos experimentais de colite e em humanos (Neurath et al., 1995; Simpson et al., 1998; Mannon et al., 2004). Outros estudos sugerem que a inibição da IL-18, fator indutor de Interferon- γ (IFN- γ), que exerce marcante atividade sinérgica com a IL-12, pode apresentar significância terapêutica.

Freitas (2007) explorou, sob aspectos morfológicos e inflamatórios, a influência da ausência de IL-18 no desenvolvimento da mucosite intestinal por CPT-11. Observando o íleo de camundongos, sugeriu que a IL-18 assume importância na cascata inflamatória que leva à mucosite, tendo em vista a proteção que animais geneticamente deficientes em IL-18 ou a administração da proteína ligante para IL-18 (IL-18bp) conferiu a esses animais, observado à análise microscópica e pela redução de síntese de citocinas pró-inflamatórias importantes.

Há considerável evidência de que a doença inflamatória intestinal e outras desordens de natureza inflamatória são reflexos de uma excessiva ativação de respostas imunes de padrão Th1 (Santucci et al., 2005; Schaefer et al., 2005). Contudo, outros estudos demonstram que a supressão de alguns membros envolvidos na cascata inflamatória de muitas patologias sugere que outros mediadores também assumem importância. Chikano e colaboradores (2000) demonstraram que a IL-18 tem se apresentado como um desses mediadores, revelando que esta citocina, em conjunto com a IL-12, induz inflamação intestinal. Demonstraram também que a lesão intestinal que se desenvolvia era fenômeno dependente de células Th1 e de IFN- γ , porém independente de TNF- α e NO. Não obstante, a produção de NO se mostrou dependente de IFN- γ , uma vez que animais *knockout* para essa última apresentavam produção diminuída de NO.

Em nosso estudo, verificamos a mucosite em outra porção do trato gastrointestinal, no duodeno. As observações foram de encontro às feitas por Freitas (2007), onde animais *knockout* para IL-18 não desenvolviam lesões tão significativas a despeito do tratamento com CPT-11. Além disso, detectamos que esses animais apresentavam menor atividade de iNOS em tecido duodenal, verificada também em animais deficientes em caspase-1, uma protease essencial para a clivagem de pró-IL-18 em IL-18 ativa, e em animais tratados com IL-18bp, sugerindo a ativação sequencial dessas espécies. Deve-se salientar que, no modelo descrito por Chikano e col (2000), a administração das citocinas IL-18 e IL-12 foi realizada em animais sem uma patologia associada, sugerindo que a interação entre os diversos mediadores possuem peculiaridades de interação de acordo com as condições patológicas em questão. De uma forma contraditória, a avaliação da estrutura histopatológica em camundongos caspase-1^{-/-} indicou pouca preservação tecidual. Porém, justifica-se a intensidade dos escores atribuídos à incidência destacada de eventos necróticos e apoptóticos de cripta e ao relativo encurtamento de vilo no animal *knockout*, mesmo considerando-se os tratados com salina.

Leung e colaboradores (2001) demonstraram que a IL-18 exerce um papel importante na ativação de neutrófilos, definindo-se uma nova via pela

qual a IL-18 pode amplificar a inflamação aguda por promover a adesão e migração de neutrófilos e a produção de citocinas e quimiocinas. Tais efeitos assumem grande relevância *in vivo* tendo em vista que a administração i.p. de IL-18 induz o recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal, efeito este inibido quando se utilizou anticorpo anti-IL-18, suprimindo-se o desenvolvimento do processo inflamatório agudo induzido por carragenina.

O acúmulo de neutrófilos no ambiente extravascular é uma característica de alterações inflamatórias, possuindo correlação direta com o processo patológico em desenvolvimento. Durante as infecções, os neutrófilos podem fagocitar e matar microrganismos suprimindo dessa forma a progressão da infecção. Contudo, a permanência dessa entidade inflamatória no sítio lesivo pode contribuir para a exacerbação do processo patológico (Bradley et al., 1982; Wagner, Roth, 2000).

Nossos dados corroboram essa observação, uma vez que animais *knockout* para IL-18 (IL-18^{-/-}) apresentaram menor atividade de mieloperoxidase, um indicativo de migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, e a administração da proteína ligante para IL-18 foi fidedigna aos achados para os animais IL-18^{-/-}, confirmando o papel pró-inflamatório dessa citocina.

Paralelamente, o papel da IL-1 β no desenvolvimento da inflamação intestinal depende do aumento na produção dessa citocina e dos níveis do seu inibidor natural, o IL-1Ra, o antagonista do receptor de IL-1. Há evidências de que o equilíbrio entre essas espécies pode afetar o resultado final de uma patologia. Horai e colaboradores (2000) demonstraram que animais geneticamente deficientes em IL-1Ra desenvolvem espontaneamente artrite reumatóide. A administração de IL-1Ra reduz a gravidade das lesões em muitos modelos de inflamação intestinal (Dinarello, 1996), incluindo colite induzida por complexos imunes em coelhos (Cominelli et al., 1992).

Contudo, no presente estudo não foi verificado qualquer efeito protetor da IL-1Ra, seja com relação aos parâmetros morfofuncionais ou inflamatórios

avaliados. Há razoável possibilidade de que a IL-1 tenha participação no desenvolvimento da mucosite, uma vez que os níveis dessa citocina se encontram elevados em modelo de mucosite intestinal, como demonstrado por Melo e colaboradores (2007) e Freitas (2007). Porém, essa citocina pode não assumir uma participação central na cascata de mediadores que levam ao desenvolvimento da mucosite, tendo em vista que o modulador de sua atividade (IL-1Ra) não protegeu contra alterações funcionais, morfológicas e inflamatórias como o fez a IL-18bp. Essa observação sugere uma possível participação secundária da IL-1 na fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por CPT-11 ao contrário do observado por Soares (2008), que verificou que a IL-1Ra, na mesma dose testada em nosso trabalho, possui importante participação na mucosite intestinal induzida por 5-Fluorouracil. Essa, portanto, é uma evidência de que a fisiopatologia da mucosite envolve complexas vias nem sempre coincidentes, quando comparados estímulos quimioterápicos diferentes, reforçando a idéia de se estudar os processos inflamatórios intestinais secundários à quimioterapia antineoplásica nos diversos contextos. A compreensão dessas diferenças poderá suscitar abordagens terapêuticas diferenciadas para a mucosite intestinal de pacientes em quimioterapia.

Melo e colaboradores (2007) demonstraram também que a Talidomida e a Pentoxifilina reduziram significativamente a gravidade da lesão intestinal e o infiltrado inflamatório secundários ao tratamento de camundongos com CPT-11. Entretanto, a pentoxifilina foi mais efetiva quanto à proteção. Discutiu-se que essa diferença de efeito poderia estar relacionada ao espectro de ação diferenciado dessas drogas sobre a síntese de citocinas pró-inflamatórias. A pentoxifilina reduzindo a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-8 e a talidomida inibindo especificamente a produção de TNF- α .

É bastante conhecida a ativação seqüencial do TNF- α e da IL-1 β como deflagadores da resposta inflamatória, bem como sua ação redundante em muitos processos patológicos, como estímulo para migração de neutrófilos (Montecucco et al., 2008; Oliveira et al., 2008) e ação sobre leucócitos, fibroblastos e células endoteliais para liberação de fatores quimiotáticos

(Abbas, Lichtman, 2005c). Apesar das similaridades de efeito, o TNF- α possui ações pró-apoptóticas que não são verificadas para a IL-1 β (Abbas, Lichtman, 2005c).

Desta forma, observa-se que a inibição isolada da ação do TNF- α ou da IL-1 β não permite modular de forma efetiva a deflagração ou a gravidade do processo patológico em desenvolvimento, tendo em vista o paralelismo de ação dessas citocinas, o que pode explicar a falta de atividade da IL-1Ra, quando administrada aos animais tratados com CPT-11 no presente estudo.

O TNF- α é uma citocina que possui muitas funções, incluindo participação na imunidade, indução de respostas inflamatórias e apoptose. Algumas das respostas ao TNF- α são mediadas pela caspase-1, que está envolvida na produção das citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33. Jain e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento de células A549 (células de adenocarcinoma de pulmão) com TNF- α induzia a expressão aumentada de RNAm para caspase-1. No presente estudo, animais *knockout* para caspase-1 apresentaram mucosite intestinal atenuada, tendo em vista a menor atividade inflamatória, bem como a proteção contra alterações morfofuncionais a despeito do tratamento com CPT-11. Essas observações, aliadas às de Melo e colaboradores (2007), sugerem que a caspase-1, ativada via TNF- α assume participação central nos eventos inflamatórios que desencadeiam a mucosite intestinal. Contudo, outros fatores podem estar associados à ativação da caspase-1, uma vez que, como discutido por Melo e col. (2007), o uso de um inibidor específico para TNF- α , talidomida, não inibe de forma efetiva o curso da mucosite intestinal, verificada pela diarreia presente nesses animais.

Canetti e colaboradores (2003) sugeriram que a IL-18 ativa a produção de LTB₄, sendo esse um dos responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos para o sítio inflamatório no modelo de artrite induzida por colágeno, onde eles podem contribuir para a resposta aguda e, até mesmo, à cronificação da doença inflamatória. Kuwabara e col. (2000), utilizando o mesmo modelo experimental, indicaram que antagonistas de LTB₄ atenuam o processo

inflamatório associado à fisiopatologia da artrite. Essas observações nos motivaram a verificar a importância dos leucotrienos para o desenvolvimento da mucosite intestinal, mediante utilização de animais *knockout* para 5-lipoxigenase (5-LOX^{-/-}), a enzima responsável pela conversão metabólica do ácido araquidônico em leucotrienos. Curiosamente, a deleção do gene para essa enzima não conferiu proteção contra a ação do CPT-11 sobre os aspectos morfológicos e inflamatórios. Porém, considerando-se os aspectos funcionais, o CPT-11 não promoveu alterações no padrão de contratilidade *in vitro* de duodeno em animais 5-LOX^{-/-} comparados com os *knockout* tratados somente com salina.

Poucas informações podem ser encontradas na literatura relacionando a ação dos leucotrienos sobre a contratilidade *in vitro* intestinal (Kawata et al., 2005; Scott, Maric, 1991). Isso se contrapõe ao amplo conjunto de relatos acerca da participação que estes mediadores lipídicos possuem em processos inflamatórios intestinais, atuando como fatores quimiotáticos (Jupp et al., 2007), mediando o aumento da permeabilidade intestinal ao atuar sobre junções paracelulares (Mazzon et al., 2006) e aumentando a liberação de acetilcolina pelo plexo mioentérico (Yoshikawa et al., 1993).

A ação modulatória positiva descrita para a 5-LOX sobre a liberação de acetilcolina por neurônios entéricos sugerido por Yoshikawa et al. (1993) pode justificar o fato de animais geneticamente deficientes para essa enzima apresentarem um padrão contrátil atenuado a despeito da administração do CPT-11. Contudo, apesar da descrição de ações diretas sobre a funcionalidade intestinal geral, incluindo-se aqui aspectos secretórios e de permeabilidade alterada que levam ao desenvolvimento de diarreia, verifica-se um posicionamento paralelo da 5-LOX no contexto da formação de mediadores alternativos, porém não menos importantes, que desencadeiam o desenvolvimento da mucosite intestinal.

Desta forma, decidimos investigar a importância desse eixo de ativação inflamatória na mucosite intestinal por CPT-11 baseado em duas razões principais: a) os leucotrienos C₄ e D₄ (LTC₄ e LTD₄) estimulam culturas

primárias de células endoteliais a sintetizar e acumular PAF (McIntyre et al., 1986); b) o PAF extracelular exerce sua ação ao se ligar ao receptor de superfície PAFr estimulando a atividade de fosfolipase A2, com conseqüente formação de fosfatos de inositol, diacilglicerol e formação de araquidonato, este último dando origem a eicosanóides, como prostaglandinas e leucotrienos (Peplow, 1999), atuando por exemplo, como fator quimiotático para neutrófilos, além de também atuar sobre a contratilidade de músculos lisos gastrintestinais, uterinos e pulmonares (Goodman, Gilman, 2003),.

No modelo desenvolvido nesse trabalho, a avaliação da participação do receptor para PAF, utilizando-se animais geneticamente deficientes para essa entidade, não se verificou qualquer proteção desses animais, frente à administração do CPT-11, seja com respeito às alterações funcionais ou sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória. Justifica-se essa observação pela provável ação intracelular PAF, podendo-se citar a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, estimulando, dessa maneira, a migração neutrofilica para fora da microvasculatura em direção ao foco de infecção (McIntyre et al., 1986). Desta forma, a não inibição da migração neutrofilica, como evidenciado pela elevada atividade de MPO, pode envolver essa ação extra-receptor PAF.

Contudo, o que se observa é uma importância paralela que esses mediadores lipídicos possuem na cascata que culmina com o desenvolvimento da mucosite. Provavelmente, o deflagrador central dessa cascata envolva realmente a via imunológica, como demonstrado em animais caspase-1^{-/-}, IL-18^{-/-} e tratados com IL-33. Wallace e colaboradores (1989) demonstraram que a participação do PAF no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda em modelos de doença inflamatória intestinal é improvável, porém sugerem que esse mediador possa assumir papel importante na fase de prolongamento da doença.

Análises realizadas *in vivo*, nas quais se administrou IL-33 a animais sem uma patologia de base, mostraram que essa citocina induz marcantes alterações patológicas em tecidos mucosos, incluindo eosinofilia de pulmão,

esôfago e intestino, além de aumentar os níveis séricos de IgA IgE, IL-5 e IL-13 (Schmitz et al., 2005). As observações percebidas no presente trabalho estão de acordo com as relacionadas com as realizadas por Schmitz e colaboradores (2005), tendo em vista que a administração de IL-33 a animais que não receberam CPT-11 induz uma marcante redução na razão vilo/cripta. Essas mudanças podem estar associadas ao aumento na expressão de IL-13, uma vez que a administração de IL-33 a animais *knockout* para IL-13 falhou em induzir alterações epiteliais intestinais.

Entretanto, a IL-33 parece exercer mais uma atividade imunoregulatória que participa no controle das respostas imunes Th2, do que uma ação pró-inflamatória, como os outros membros da família IL-1. Schmitz e colaboradores (2005) propuseram que a IL-33 inicia uma seqüência de ativação por recrutar o adaptador MyD88, a quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK1,4) e a ubiquitina ligase, fator associado ao receptor de TNF (TRAF), a partir do receptor ST2, ativando MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos) e NF- κ B (fator de necrose kappa B), regulando a transcrição de citocinas tipicamente associadas à resposta Th2, tal como IL-4, IL-5 e IL-13.

A teoria da regulação das respostas imunes envolve a homeostase entre atividade Th1 e Th2. Essa hipótese, surgida em 1986, baseou-se nos diferentes padrões de citocinas liberadas pelo sistema imune de camundongos e foi adaptada para as respostas imunes observadas em humanos. Considerando-se o desequilíbrio Th1/Th2 existente em diversas patologias (Marques et al., 2006; Raghupathy, 2001; Schulze-koops, Kalden, 2001) e a participação da via de ativação de citocinas importantes na resposta imune Th1 na patogênese da mucosite intestinal, possivelmente a administração de IL-33 poderia modular negativamente a progressão da lesão na mucosite.

Diferentes abordagens, envolvendo citocinas de padrão Th2, inibidores de citocinas de padrão Th1 ou manipulação por engenharia genética de células para produzirem IL-4, foram aplicadas e suportam a idéia de interferência de um padrão Th2 emergente sobre a ação pró-inflamatória de citocinas Th1,

prevenindo, por exemplo, a destruição tecidual sinovial na artrite reumatóide (Schulze-koops, Kalden, 2001).

Carriere e colaboradores (2007) demonstraram que células endoteliais constituem grande fonte de RNAm e de proteína IL-33 *in vivo*. Através de técnicas de hibridização *in situ*, verificaram que vasos sanguíneos de tecidos inflamados, coletados de pacientes com artrite reumatóide ou com doença de Crohn, expressavam RNAm para IL-33, sugerindo que a IL-33 possa ter um papel importante no endotélio durante o processo inflamatório.

Em comum com a IL-1 α , a IL-33 tem um papel dentro da célula, ao se acumular no núcleo e se associar com a heterocromatina e com a eucromatina. A região N-terminal parece ser responsável por uma propriedade repressora transcricional da IL-33 (Carriere et al., 2007). A implicação desse estudo é que a IL-33 pode atuar como um co-repressor de genes pró-inflamatórios, promovendo, assim, um fenótipo Th2 antiinflamatório, assumindo uma importância particular quanto ao conhecimento do papel dessa citocina como fator nuclear no contexto da inflamação. Desta forma, justifica-se a menor atividade de mieloperoxidase, menor grau de diarreia e contratilidade duodenal verificada *in vitro* em animais tratados com IL-33 e que receberam CPT-11.

No contexto da cascata de ativação Caspase-1 \rightarrow IL-18 \rightarrow NO, decidimos investigar o envolvimento do óxido nítrico no desenvolvimento da mucosite intestinal. O óxido nítrico (NO) está associado a algumas das mais importantes imunopatologias, incluindo artrite reumatóide, diabetes, lupus eritematoso sistêmico e choque séptico, além de participar como molécula efetora na defesa contra patógenos (revisado por Niedbala et al., 2006). Uma característica comum entre essas doenças é um proeminente papel de células Th1 (Bogdan et al., 2000; Liew, 2002). Células Th1 produzem IFN- γ que ativam macrófagos a produzir altas concentrações de NO via iNOS. Em contraste, células Th2 induzem a expressão de IL-4 e IL-5, que podem inibir a indução de iNOS pelo IFN- γ (Liew et al., 1991; Bogdan et al., 1994).

Observações anteriores, feitas por Leitão e colaboradores (2006), no contexto da mucosite oral por 5-fluorouracil, sugerem a participação do óxido nítrico na fisiopatologia dessa condição. Levantou-se a hipótese de participação do óxido nítrico, produzido via iNOS, no desenvolvimento das lesões intestinais pós administração de CPT-11. Os resultados no presente estudo corroboraram essa hipótese, tendo em vista o efeito protetor da aminoguanidina sobre a razão vilos/cripta, influenciada por menor perda na altura dos vilos e menor comprometimento da arquitetura das criptas a despeito do tratamento com CPT-11. De forma a confirmar essas observações, animais *knockout* para iNOS foram utilizados como ferramenta experimental, obtendo-se resultado similar.

Durante condições fisiológicas normais, o epitélio intestinal não se apresenta constantemente inflamado, o que se deve em grande parte às junções intercelulares que restringem a passagem de bactérias e produtos bacterianos, como o LPS, do lúmen para o interstício mucoso (Nusrat et al., 2000). A lesão intestinal que se segue à administração do CPT-11 está associada ao grande infiltrado inflamatório na parede intestinal (Kurita et al., 2000; Melo et al., 2008). Neste trabalho, o infiltrado neutrofílico no sítio de lesão foi avaliado indiretamente pelo ensaio da mieloperoxidase. Interessantemente, encontrou-se uma marcante redução na atividade de MPO em segmentos duodenais de camundongos iNOS^{-/-} e de animais tratados com aminoguanidina. Os efeitos do NO sobre a função fisiológica normal, e nos processos lesivos, varia desde uma participação benéfica até efeitos prejudiciais, a depender da concentração local. Em altas concentrações, o NO promove lesão intestinal e perda da função da barreira epitelial. Xu e colaboradores (2002) demonstraram que o aumento da atividade de iNOS está diretamente relacionada com os efeitos lesivos de endotoxinas sobre a integridade intestinal, verificando-se perda na viabilidade celular, associada à lesão em vilos, culminando com a perda funcional da barreira intestinal, aumento da permeabilidade e facilitação ao processo de translocação bacteriana. Em contraste, tem sido demonstrado que o NO reduz a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, reduzindo, desta forma, o infiltrado neutrofílico para o sítio de lesão (Kubes et al., 1991; Dal Secco et al.,

2003). A principal razão para essas observações contraditórias, requer maior investigação. Contudo, essas diferenças parecem estar relacionadas com peculiaridades, bem como com o curso temporal das condições patológicas em consideração. O nível de NO produzido localmente, a isoforma de NOS envolvida, o grau de atividade das células epiteliais relacionado ao estresse tecidual e outros fatores relacionados ao ambiente celular podem influenciar o fator resultante da ação do NO sobre a lesão ou proteção da mucosa (Shah et al., 2004).

Hierholzer e colaboradores (2004) propuseram que um aumento primário da atividade de iNOS contribui para a resposta inflamatória na parede intestinal durante o choque hemorrágico e participa na ativação de uma cascata de mediadores e expressão de citocinas que regulam a lesão intestinal, recrutamento de neutrófilos e comprometimento da motilidade intestinal. Avaliando os níveis de citocinas em segmentos de duodeno coletados de animais tratados com CPT-11, verificamos-se uma elevação nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e do análogo da IL-8 humana em camundongos, KC. Quando realizada essa pesquisa em animais deficientes para o gene da iNOS que receberam CPT-11, foi encontrada redução significativa nas concentrações dessas citocinas, em comparação com animais selvagens tratados com CPT-11, similarmente ao verificado em inúmeras condições inflamatórias, provavelmente envolvendo um mecanismo de menor ativação de células residentes. Além disso, uma menor liberação de KC localmente por essas células pode adicionalmente levar a um menor recrutamento de neutrófilos para o sítio de lesão, como sugerido através da mensuração da atividade de mieloperoxidase nesses animais. Uma menor expressão de citocinas pode ser também consequência da falta de produção de NO via iNOS bem como de uma possível redução na produção local de outras espécies reativas (Riaz et al., 2003). Adicionalmente, a atenuação nos níveis teciduais dessas citocinas sem, completa supressão, é um indicativo de que a própria IL-1 pode ser um ativador de iNOS. Complementarmente, o elevado número de células imuno-marcadas para iNOS em animais tratados com CPT-11, o que não foi observado em animais iNOS^{-/-}, reforça o papel

fundamental que a iNOS assume com relação ao desenvolvimento da mucosite intestinal.

Já é bem estabelecido o papel do CPT-11 em promover alterações morfológicas gastrintestinais, levando ao dano de vilos e redução da área de absorção e desenvolvimento de diarreia. Mudanças histopatológicas têm sido descritas em muitos estudos experimentais em animais (Ikuno 1995; Gibson *et al.*, 2003, Melo *et al.*, 2008). Neste estudo, verificamos que ao modular a produção de NO, mediante inibição da enzima iNOS, obtém-se redução da gravidade da diarreia apresentada pelos animais, secundária à mucosite intestinal. O mecanismo envolvido se mostrou principalmente inflamatório e o controle dos fatores pró-inflamatórios resultou em eventos diarréicos atenuados. Tendo em vista que a diarreia é primariamente uma desordem de motilidade intestinal, seria de importância também primária um estudo no sentido de se verificar diretamente as alterações funcionais da musculatura lisa intestinal.

Um dos achados clínicos, de importância singular, no que se refere à mucosite intestinal induzida por antineoplásicos, é o desenvolvimento de diarreia severa associada em até 25% dos pacientes (Keefe *et al.*, 2007). Entende-se que a diarreia, em pacientes oncológicos sob quimioterapia, é um efeito colateral debilitante e de potencial risco à vida quando não tratada adequadamente. Uma consequência do tratamento envolve a repercussão funcional sobre o trato gastrintestinal dias ou meses após o término do tratamento, justificando o desenvolvimento de um conhecimento experimental sobre aspectos funcionais. Contudo, não há relato na literatura sobre a repercussão de mediadores inflamatórios como modificadores de aspectos funcionais intestinais.

Os resultados apresentados neste trabalho revelam que o CPT-11 induz alterações contráteis no duodeno de camundongos, verificadas em experimentos de contratilidade *in vitro*. Essas alterações podem estar relacionadas aos eventos de diarreia observados em camundongos tratados com o Irinotecano. Muitos estudos de várias regiões do trato gastrintestinal em

diversas espécies animais têm implicado um papel do NO nas contrações espontâneas (Plujà *et al.*, 1999; Caballero-Alomar *et al.*, 2003; Grasa *et al.*, 2005). Outros estudos (Eskandari *et al.*, 1997; Kalff *et al.*, 2000) fornecem evidências do papel da enzima iNOS na regulação da contratilidade da musculatura lisa intestinal. Segundo esses estudos, o NO regula negativamente, via iNOS, a função do músculo liso através do mecanismo de ativação de moléculas de adesão e infiltrado de células polimorfonucleares na camada muscular do jejuno de roedores. Esses dados enfocaram condições inflamatórias agudas, utilizando modelos animais de doença de Crohn, ileus (síndrome de oclusão intestinal), ou na presença de parasitas, onde o NO apresenta-se como um mediador inibitório e conseqüentemente tem-se o impedimento da motilidade normal do intestino.

No protocolo desenvolvido nesse trabalho, onde um agente quimioterápico é administrado, foi encontrado *in vitro* um aumento da motilidade intestinal induzida por acetilcolina ou betanecol, como verificado *in vitro*, corroborando os achados para a diarreia. Além disso, altos níveis de NO sendo produzidos localmente na parede intestinal implicou maior lesão e aumento da resposta contrátil à acetilcolina. De maneira contrária, animais deficientes para a enzima iNOS, bem como animais tratados com aminoguanidina, não desenvolveram aumento de motilidade, mesmo tratados com CPT-11, de uma maneira até mais efetiva que a loperamida, um agonista periférico do receptor μ -opióide.

É bem conhecido que a exposição crônica a agentes opióides resulta em tolerância. Tan-NO e colaboradores (2003) discutem o efeito inibitório de doses de loperamida administradas repetidamente. Essa é uma droga largamente utilizada na prática clínica como agente antidiarréico e, segundo esses pesquisadores, o organismo rapidamente desenvolve tolerância para o efeito inibitório da loperamida sobre o trânsito gastrintestinal de camundongos após somente dois dias de dupla administração da droga. Por essa razão e, considerando o longo período de administração do CPT-11, decidiu-se adotar um esquema de duas doses distintas para experimentação. Em adição, a incipiente tolerância descrita anteriormente pode ser a causa de um efeito

inibitório sobre a contratilidade *in vitro* menor da loperamida comparada àquele observado em animais deficientes para iNOS^{-/-} ou tratados com aminoguanidina.

Adicionalmente ao aumento da atividade funcional motora, foi mensurada a espessura da camada muscular (circular mais longitudinal). De acordo com os resultados, o CPT-11 aumentou a espessura dessa camada, o que pode ser consequência do processo inflamatório estabelecido, levando ao aumento da resposta ao estímulo excitatório, aumento da função motora intestinal e, finalmente, desencadeamento de eventos de diarreia. Essa hipótese é ainda mais reforçada pelo fato de o tratamento de animais com aminoguanidina e animais iNOS^{-/-} não apresentarem alteração nesse parâmetro. Contudo, outras possibilidades envolvem hipertrofia, hiperplasia e edema tecidual.

Moreels e colaboradores (2001) estudaram funcionalmente o íleo de ratos pós-injeção de TNBS (ácido trinitro-benzeno sulfônico) e verificaram que a exacerbação contrátil ileal na fase pós-inflamatória poderia estar relacionada ao aumento da massa muscular total devido ao processo inflamatório previamente estabelecido sem, no entanto, haver aumento na capacidade contrátil de cada célula individualmente. Contudo, deve-se considerar a possibilidade de *up-regulation* de receptores de mediadores contráteis, como acetilcolina, substância P, 5-hidroxitriptamina, prostaglandinas ou até mesmo mudanças no padrão de atividade de canais iônicos e plexo nervoso mioentérico. Martinolle e colaboradores (1997) estudaram, em modelo de ileíte induzida por TNBS em cobaias, as alterações no padrão de contratilidade *in vitro* da musculatura longitudinal e circular intestinais, sugerindo que o estímulo químico induz responsividade diferenciada do tecido a diferentes agonistas contráteis. Blandizzi e colaboradores (2001) sugeriram que os eventos adversos colinérgicos do CPT-11 provavelmente não envolvem a inibição da acetilcolinesterase. Contudo, diversos outros estudos contrapõem essa informação (Dodds; Rivory, 1999; Morton et al., 1999; Dodds; Rivory, 2001). Esse portanto, poderia ser outro mecanismo de homeostase tecidual com reflexo nas fases tardias dos eventos de diarreia, uma vez que no presente

estudo a resposta ao mediador colinérgico está aumentada, corroborando essas hipóteses.

Adicionalmente às possíveis alterações em neurônios do plexo mioentérico, podem-se encontrar alterações no padrão de esvaziamento e de contratilidade do fundo gástrico, bem como uma diminuição do trânsito intestinal. Porém, o papel das células intersticiais de Cajal pode ser descartado tendo em vista que não se verificou alteração na frequência das contrações espontâneas a despeito da administração do CPT-11 (dados não mostrados). De forma complementar, Martinolle e colaboradores (1995) verificaram que em intestino de cobaias inflamado pós-injeção de TNBS ocorre alteração da população de adrenoreceptores, efeito este influenciado por leucotrienos, porém sem influência de prostanoídes. Em nossas condições experimentais, nenhuma dessas possibilidades foi testada. Porém, não pode ser descartada a importância desses fatores, baseando-se apenas no espessamento da camada muscular.

Em todos os experimentos realizados, observou-se uma marcante leucopenia secundária ao tratamento dos animais com CPT-11. A presença de leucopenia destaca que o efeito do antineoplásico permanece a despeito das observações, em muitas situações, de inibição sobre o desenvolvimento da mucosite. Esse fato permite sugerir que as ações não eram decorrentes da perda de atividade do CPT-11, mas sim de uma ação realmente moduladora da atividade inflamatória desses mediadores.

A maior contribuição desse trabalho consistiu em sugerir de forma inédita a participação de uma cascata seqüencial de mediadores envolvendo citocinas da família IL-1 e óxido nítrico no desenvolvimento da mucosite intestinal em camundongos secundária ao tratamento com o antineoplásico irinotecano (CPT-11). Em síntese, a inibição dessas citocinas culmina com a redução na síntese de óxido nítrico mediante diminuição da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida, como ilustrado na figura 75.

Grupo	razão viló/cripta	Escore histopatológico	Diarréia	MPO	Contratibilidade	Leucopenia	Produção de NO	IL-1beta	KC	Espess. muscular
C57BL/6 – CPT-11	↓	↑	↑	↑	↑	Sim	↑			↑
SWISS – CPT-11	↓	↑	↑	↑	↑	Sim				
Caspase 1 -/- Salina	#	#	#	#	#	Sim	#			
Caspase 1 -/- CPT-11	#	↑	#	#	#	Sim	#			
IL-1RA + Salina	#	#	#	#	#	Sim				
IL-1RA + CPT-11	↓	↑	↑	↑	↑	Sim				
IL-18 -/- + Salina	#	#	#	#	#	Sim	#			
IL-18 -/- + CPT-11	#	#	atenuada	#	#	Sim	#			
IL-18 bp + CPT-11	#	#	atenuada	#	#	Sim	#			
+ IL-33 + Salina	↓	#	#	#	#	Sim				
+ IL-33 + CPT-11	↓	#	atenuada	#	#	Sim				
INOS -/- + Salina	#	#	#	#	#	Sim				#
INOS -/- + CPT-11	#	#	atenuada	#	#	Sim		atenuada	atenuada	#
AMG + CPT-11	#	#	atenuada	#	#	Sim				#
5-LOX -/- + Salina	#	#	-	#	#	Sim				
5-LOX -/- + CPT-11	↓	↑	-	↑	#	Sim				
PAFR -/- + Salina	#	#	-	#	#	Sim				
PAFR -/- + CPT-11	↓	↑	-	↑	↑	Sim				
LOP + Salina	#	#	#	#	#	Sim				
LOP + CPT-11	↓	↑	atenuada	↑	#	Sim				

= Normal; ↓ = Reduzido; ↑ = Elevado

6. CONCLUSÕES

Em conjunto os dados apresentados nesse trabalho permitem concluir que:

- A via de sinalização celular caspase-1/Interleucina-18/óxido nítrico parece assumir papel fundamental na cascata de mediadores que levam ao desenvolvimento das alterações morfofuncionais e do processo inflamatório associados à fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por CPT-11;
- A interleucina-33 parece ter papel modulatório negativo sobre o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por CPT-11;
- Mediadores lipídicos, como os leucotrienos, formados pela via da 5-lipoxigenase, e o PAF, atuando via receptor PAFr, parecem assumir um papel secundário na via inflamatória de desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por CPT-11.

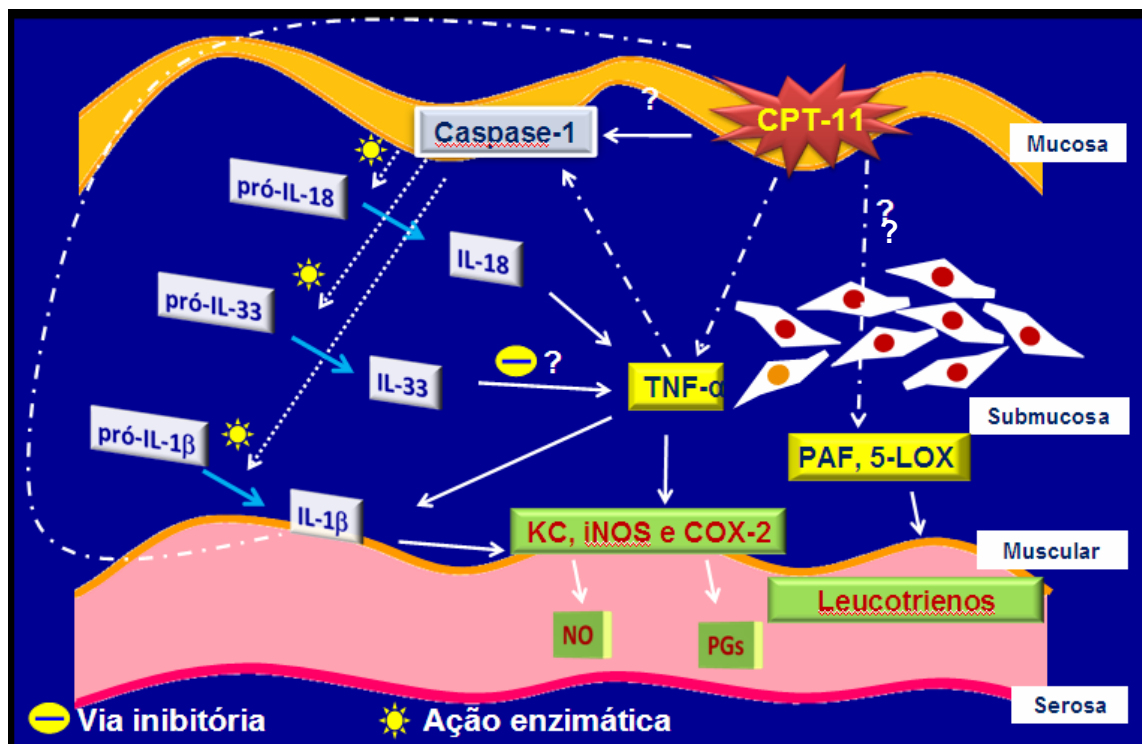


Figura 75 – Modelo hipotético proposto da patogênese da mucosite intestinal induzida pelo tratamento com CPT-11.

Baseado nas observações da atual literatura, em conjunto com os dados obtidos no presente trabalho, sugere-se que a injeção de CPT-11 leva em células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, à ativação da protease caspase-1, direta ou indiretamente, via TNF- α . Uma vez ativada, essa protease cliva a pró-IL-1 β , pró-IL-33 e pró-IL-18 em formas ativas, que são, por conseguinte, liberados no meio extracelular para interagirem com seus respectivos receptores. A IL-1 β e a IL-18 ativam fatores de transcrição celulares para síntese de outras citocinas, quimiocinas, iNOS e COX-2, com posterior liberação de NO e prostanóides. A IL-33, por sua vez, assume papel modulatório negativo sobre essa cascata de ativação. Paralelamente ao desenvolvimento de lesão tecidual, sugere-se a participação do PAF e leucotrienos, porém em caráter secundário, na cascata de ativação de mediadores inflamatórios principais envolvidos na fisiopatologia da mucosite intestinal induzida por CPT-11.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Mecanismos efetores da imunidade mediada por células, in *Imunologia Celular e Molecular*, Tradução da 5ª edição, Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, p. 549, 2005a.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Mecanismos efetores da imunidade mediada por células, in *Imunologia Celular e Molecular*, Tradução da 5ª edição, Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, p. 307-326, 2005b.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Citocinas, in *Imunologia Celular e Molecular*, Tradução da 5ª edição, Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, p. 251-282, 2005c.

AERSSSENS, J.; HILLSLEY, K.; PEETERS, P.J.; DE HOOGT, R.; STANISZ, A.; LIN, J.H.; VAN DEN WYNGAERT, I.; GÖHLMANN, H.W.; GRUNDY, D.; STEAD, R.H.; COULIE, B. Alterations in the brain-gut axis underlying visceral chemosensitivity in *Nippostrongylus brasiliensis*-infected mice. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1375-87, 2007.

ANDO, Y.; FUJITA, K.; SASAKI, Y.; HASEGAWA, Y. UGT1A1*6 and UGT1A1*27 for individualized irinotecan chemotherapy. **Curr Opin Mol Ther**, v. 9, p. 258-62, 2007.

ANTIN, J.H.; LEE, S.J.; NEUBERG, D.; ALYEA, E.; SOIFFE, R.J.; SONIS, S.; FERRARA, J.L.M. A phase I/II double-blind, placebocontrolled study of recombinant human interleukin-11 for mucositis and acute GVHD prevention in allogeneic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, v. 29, p. 373-377, 2002.

ARAÚJO, P.V.; CLEMENTE, C.M.; DA GRAÇA, J.R.; ROLA, F.H.; DE OLIVEIRA, R.B.; DOS SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J. Inhibitory effect of sildenafil on rat duodenal contractility in vitro: putative cGMP involvement. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, n. 3, p. 191-5, 2005.

BALIS FM, SAVITCH JL, BLEYER WA, REAMAN GH, POPLACK DG. Remission induction of meningeal leukemia with high-dose intravenous methotrexate. **J Clin Oncol.**, v. 3, n. 4, p. 485-489, 1985.

BARKSBY, H.E.; LEA, S.R.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J.J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **Clin Exp Immunol**, 149: 217–225, 2007.

BERCIK, P.; DE GIORGIO, R.; BLENNERHASSETT, P.; VERDU, E.F.; BARBARA, G.; COLLINS, S.M. Immune-mediated neural dysfunction in a murine model of chronic *Helicobacter pylori* infection. **Gastroenterology**, v. 123, p. 1205-15, 2002.

BERGERS, G.; REIKERSTORFER, A.; BRASELMANN, S.; GRANINGER, P.; BUSSLINGER, M. Alternative promoter usage of the Fos-responsive gene Fit-1

generates mRNA isoforms coding for either secreted or membrane-bound proteins related to the IL-1 receptor. **EMBO J**, v. 13, p. 1176–1188, 1994.

BISHOP JF, JOSHUA DE, LOWENTHAL RM, KRONENBERG H, WHITESIDE MG, COBCROFT R, DODDS A, WOLF M, MANOHARAN A. A phase I-II study of cytosine arabinoside, daunorubicin, and VP16-213 in adult patients with acute non-lymphocytic leukemia. **Aust N Z J Med.**, 6(1):48-51, 1986.

BLANDIZZI, C.; DE PAOLIS, B. ; COLUCCI, R.; LAZZERI, G.; BASCHIERA, F.; DEL TACCA, M. Characterization of a novel mechanism accounting for the adverse cholinergic effects of the anticancer drug irinotecan. **Br J Pharmacol.**, v. 132, n. 1, p. 73-84, 2001.

BLIJLEVENS NM, DONNELLY JP, PAUW BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. **Bone Marrow Transplant**, 25:1269–1278, 2000.

BLIJLEVENS, N.; SONIS, S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis, **Ann Oncol.**, v. 18, n. 5, p. 817-26, 2007.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 12, p. 64-76, 2000.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; PAIK, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 55, p. 227-33, 1994.

BRADLEY, P.P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 206-9, 1982.

BURNS, A.J. Disorders of interstitial cells of Cajal. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 45, Suppl 2, p. S103-6, 2007.

CABALLERO-ALOMAR, C.; SANTOS, C.; LOPEZ, D.; METAFIL, M.T.; PUIG-PARELLADA, P. Sources and implications of basal nitric oxide in spontaneous contractions of guinea pig *Taenia caeci*. **Am J Physiol**, v. 285, p. G747-G753, 2003.

CABALLERO GA, AUSMAN RK, QUEBBEMAN EJ. Longterm, ambulatory, continuous IV infusion of 5-FU for the treatment of advanced adenocarcinomas. **Cancer Treat Rep.**, 69(1):13–15, 1985.

CALABRESE, E.J. Nitric oxide: biphasic dose responses. **Crit Rev Toxicol**, v. 31, p. 489-501, 2001.

CANETTI, C.A.; LEUNG, B.P.; CULSHAW, S.; MCINNES, I.B.; CUNHA, F.Q.; LIEW, F.Y. IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. **J Immunol**, v. 171, n. 2, p. 1009-15, 2003.

CARRIERE, V. ; ROUSSEL, L.; ORTEGA, N. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 282-7, 2007.

CETIN, S.; LEAPHART, C.L.; LI, J.; ISCHENKO, I.; HAYMAN, M.; UPPERMAN, J.; ZAMORA, R.; WATKINS, S.; FORD, H.R.; WANG, J.; HACKAM, D.J. Nitric Oxide Inhibits Enterocyte Migration through Activation of RhoA-GTPase in a SHP-2 Dependent Manner. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 292, n. 5, p. G1347-58, 2007.

CHADWICK, V.S.; CHEN, W.; SHU, D.; PAULUS, B.; BETHWAITE, P.; TIE, A.; WILSON, I. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 122, n. 7, p. 1778-83, 2002.

CHAMPOUX, J.J. DNA topoisomerases: structures, function, and mechanism. **Annu. Rev. Biochem.** v. 70, p. 369-413, 2001.

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. 1125-1132, 2003.

CHIKANO, S.; SAWADA, K.; SHIMOYAMA, T; KASHIWAMURA, S.I.; SUGIHARA, A.; SEKIKAWA, K.; TERADA, N.; NAKANISHI, K.; OKAMURA, H. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN- γ dependent manner. **Gut**, v. 47, p. 779-86, 2000.

COCKCROFT, J.R. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. **AJH**, v. 18, p. 177S-183S, 2005.

COMINELLI, F.; NAST, C.C.; DUCHINI, A.; LEE, M. Recombinant interleukin-1 receptor antagonist blocks the proinflammatory activity of endogenous interleukin-1 in rabbit immune colitis. **Gastroenterology**, v. 103, p. 65-71, 1992.
CREAGH, E.M.; CONROY, H.; MARTIN, S.J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev.**, v. 193, p. 10-21, 2003.

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.

CUNNINGHAM, D.; PYRHONEN, S.; JAMES, R.D. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluoruracil

failure for patients with metastatic colorectal cancer. **Lancet**, v. 352, p. 1413-8, 1998.

DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p. 153-164, 2003.

Di LORENZO C. Pseudo-obstruction: current approaches. **Gastroenterology**, v. 116, p. 980–7, 1999.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines, **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503–508, 2000.

DINARELLO, C.A.; FANTUZZI, G. Interleukin-18 and host defense against infection. **J Infect Dis**, v. 187, (Suppl. 2), p. S370–84, 2003.

DINARELLO, C.A. An IL-1 family member requires caspase-1 processing and signals through the ST2 receptor. **Immunity**, v. 23, p. 461–2, 2005.

DINARELLO, C.A. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. **Am J Clin Nutr**, v. 83 (suppl), p. 447S–55S, 2006.

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

DODDS, H.M.; RIVORY, L.P. Comments on Blandizzi et al. Characterization of a novel mechanism accounting for the adverse cholinergic effects of the anticancer drug irinotecan. (2001) **Br J Pharmacol.**, v. 134, n. 2, p. 448–449, 2001.

DONNELLY JP, MUUS P, SCHATTENBERG A, DE WITTE T, HORREVORTS A, DEPAUW BE. A scheme for daily monitoring of oral mucositis in allogeneic BMT recipients. **Bone Marrow Transplant.**, 9:409–413, 1992.

DÖRING, B.; PFITZER, G.; ADAM, B.; LIEBREGTS, T.; ECKARDT, D.; HOLTSMANN, G.; HOFMANN, F.; FEIL, S.; FEIL, R.; WILLECKE, K. Ablation of connexin43 in smooth muscle cells of the mouse intestine: functional insights into physiology and morphology. **Cell Tissue Res**, v. 327, n. 2, p. 333-42, 2007.

DUKE, J.A.; AYENSU, E.S.; ALGONAC, MI, **Medicinal Plants of China** Reference Publications, Inc., 1985. Disponível em: <<http://biotech.icmb.utexas.edu/botany/camphist.html>>. Acesso em: 10 fevereiro 2008.

ELTING LS, BODEY GP, KEEFE BH. Septicemia e shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. **Clin. Infect. Dis.**, 14:1201-1207, 1992.

ENGELKING C, RUTLEDGE DN, IPPOLITI C, NEUMANN J, HOGAN CM. Cancer related diarrhea: a neglected cause of cancer-related symptom distress. **Oncol Nurs Forum**, v. 25, p. 859-860, 1998.

ESKANDARI, M.K.; KALFF, J.C.; BILLIAR, T.R.; LEE, K.K.W.; BAUER, A.J. Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular smooth muscle activity. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 36, p. G727-G734, 1997.

ESMON, C.T. Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation. **Crit Care Méd**, v. 29, p. S48–S51, 2001.

FANTUZZI, G.; DINARELLO, C.A. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). **J. Clin. Immunol.**, v. 19, p. 1-11, 1999.

FANTUZZI, G.; KU, G.; HARDING, M.W.; LIVINGSTON, D.J.; SIPE, J.D.; KUIDA, K.; FLAVELL, R.A.; DINARELLO, C.A. Response to local inflammation of interleukin-1-converting enzyme- deficient mice. **J. Immunol.**, v. 158, p. 1818-1824, 1997.

FINKELMAN, F.D.; ROTHENBERG, M.E.; BRANDT, E.B.; MORRIS, S.C.; STRAIT, R.T. Molecular mechanisms of anaphylaxis: lessons from studies with murine models. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, p. 449-57, 2005.

FLAMANT, M., BOURREILLE, A. Biologic therapies in inflammatory bowel disease: anti-TNF and new therapeutic targets. **Rev Med Interne**, v. 28, n. 12, p. 852-61, 2007.

FREITAS, H.C. Envolvimento da interleucina-18 (IL-18) na patogênese da mucosite gastrointestinal induzida pelo cloridrato de irinotecano (CPT-11). 2007, 104f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

GACHTER, T.; WERENSKIOLD, A.K.; KLEMENZ, R. Transcription of the interleukin-1 receptor-related T1 gene is initiated at different promoters in mast cells and fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 271, p. 124–129, 1996.

GERDES, N.; SUKHOVA, G.K.; LIBBY, P. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. **J Exp Med**, v. 195, p. 245–257, 2002.

GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; INGLIS, M.R.; 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. 1095-1100, 2003.

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

GÖKE, M.; PODOLSKY, D.K. regulation of the mucosal epithelial barrier. **Clinical Gastroenterology**, vol. 10, No. 3, p. 393-405, 1996.

GOMES, D.A.; REIS, W.L.; VENTURA, R.R.; GIUSTI-PAIVA, A.; ELIAS, L.L.; CUNHA, F.Q.; ANTUNES-RODRIGUES, J. The role of carbon monoxide and nitric oxide in hyperosmolality-induced atrial natriuretic peptide release by hypothalamus in vitro. **Brain Res**, v. 1016, n.1, p. 33-9, 2004.

GÓMEZ-CAMBRONERO, L.; CAMPS, B.; DE LA ASUNCIÓN, J.G.; CERDÁ, M.; PELLÍN, A.; PALLARDÓ, 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.

GOODMAN AND GILMAN. Autacóides derivados de lipídios in As bases farmacológicas da terapêutica. Tradução da 10ª edição, Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, 2003.

GRACIE, J.A.; ROBERTSON, S.E.; MCINNES, I.B. Interleukin-18. **J Leukoc Biol**, v. 73, p. 213-24, 2003.

GRASA, L.; REBOLLAR. E.; ARRUEBO, M.P.; PLAZA, M.A.; MURILLO, M.D. The role of NO in the contractility of rabbit small intestine in vitro: effect of K⁺ channels. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 407-419, 2005.

GUICHARD, S.; TERRET, C.; HENNEBELLE, I.; LOCHON, I.; CHEVREAU, P.; FRÉTIGNY, E.; SELVES, J.; CHATELUT, E.; BUGAT, R. CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase activities in tumour and normal colon and liver tissues. **Br J Cancer**, v. 80, p. 364-70, 1999.

HAN, X.; FINK, M.P.; DELUDE, R.L. Proinflammatory cytokines cause NO*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. **Shock**, v. 19, p. 229-237, 2003.

HIERHOLZER, C.; KALFF, J.C.; BILLIAR, T.R.; BAUER, A.J.; TWEARDY, D.J.; HARBRECHT, B.G. Induced nitric oxide promotes intestinal inflammation following hemorrhagic shock. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 286, p. G225-G233, 2004.

HORAI, R.; SAIJO, S.; TANIOKA, H.; NAKAE, S.; SUDO, K.; OKAHARA, A.; IKUSE, T.; ASANO, M.; IWAKURA, Y. Development of chronic inflammatory

arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. **J. Exp. Med**, v. 191, p. 313-320, 2000.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 11, p. 1349-1353, 1981.

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

IRMLER, M.; HERTIG, S.; MACDONALD, H.R.; SADOUL, R.; BECHERER, J.D.; PROUDFOOT, A.; SOLARI, R.; TSCHOPP, J. Granzyme A is an interleukin 1 α -converting enzyme. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 1917-1922, 1995.

JAIN, N.; SUDHAKAR, C.H.; SWARUP, G. Tumor necrosis factor- α -induced caspase-1 gene expression. Role of p73. **FEBS J**, v. 274, n. 17, p. 4396-407, 2007.

JUPP, J.; HILLIER, K.; ELLIOTT, D.H.; FINE, D.R.; BATEMAN, A.C.; JOHNSON, P.A.; CAZALY, A.M.; PENROSE, J.F.; SAMPSON, A.P. Colonic expression of leukotriene-pathway enzymes in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 5, p. 537-46, 2007.

KALFF, J.C.; SCHRAUT, W.H.; BILLIAR, T.R.; SIMMONS, R.L.; BAUER, A.J. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction in rodents. **Gastroenterology**, v. 118, p. 316-327, 2000.

KARASAWA, K. Clinical aspects of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, p. 1359-72, 2006.

KAWATA, H.; HIRANO, K.; NISHIMURA, J.; KUBO, C.; KANAIDE, H. The mechanism underlying the contractile effect of a chemotactic peptide, formyl-Met-Leu-Phe on the guinea-pig *Taenia coli*. **Br J Pharmacol**, v. 145, n. 3, p. 353-63, 2005.

KEEFE, D.M. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Current Opinion in Oncology**, v. 19, p. 323-327, 2007.

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.; Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**, v. 109, n. 5, p. 820-31, 2007.

KENEDY, B.J. Evolution of chemotherapy. **CA Cancer J Clin**, v. 41, p. 261-63, 1991.

KOIZUMI, F.; KITAGAWA, M.; NEGISHI, T.; ONDA, T.; MATSUMOTO, S.; HAMAGUCHI, T.; MATSUMURA, Y. Novel SN-38-Incorporating Polymeric

Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor–Secreting Bulky Tumors. **Cancer Res**, v. 66, n. 20, p. 10048-10056, 2006.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 11, p. 4651-4655, 1991.

KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. Nitric oxide and intestinal inflammation. **Am J Med**, v. 109, p. 150-158, 2000.

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

KUWABARA, K.; YASUI, K.; JYOYAMA, H.; MARUYAMA, T.; FLEISCH, J.H.; HORI, Y. Effects of the second-generation leukotriene B4 receptor antagonist, LY293111Na, on leukocyte infiltration and collagen-induced arthritis in mice. **Eur. J. Pharmacol**, v. 402, n. 3, p. 275-85, 2000.

LANAHAN, A.; WILLIAMS, J.B; SANDERS, L.K.; NATHANS, D. Growth factor-induced delayed early response genes. **Mol Cell Biol**, v. 12, p. 3919–3929, 1992.

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

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

LEUNG, B.P.; CULSHAW, S.; GRACIE, J.A.; HUNTER, D.; CANETTI, C.A.; CAMPBELL, C.; CUNHA, F.Q.; LIEW, F.Y.; MCINNES, I.B. A role for IL-18 in neutrophil activation. **J Immunol**, v. 167, n. 5, p. 2879-86, 2001.

LIEW, F.Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. **Nat Rev Immunol**, v. 2, p. 55-60, 2002.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M.V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur J Immunol**, v. 21, p. 3009-14, 1991.

LIEW, F.Y.; XU, D.; BRINT, E.K.; O'NEILL, L.A. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 5, p. 446–458, 2005.

LIMA V, BRITO GAC, CUNHA FQ, REBOUÇAS CG, FALCÃO BAA, AUGUSTO RF, SOUZA MLP, LEITÃO BT, RIBEIRO RA. Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur J Oral Sci.**, 113(3): 210–217, 2005.

MADDENS S, CHARRUYER A, PLO I, DUBREUIL P, BERGER S, SALLES B, LAURENT G, JAFFREZOU JP. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma 1: implication in stem cell factor radioprotective effect. **Blood**, 100:1294-1301, 2002.

MANNON, P.J.; FUSS, I.J.; MAYER, L.; ELSON, C.O.; SANDBORN, W.J.; PRESENT, D.; DOLIN, B.; GOODMAN, N.; GRODEN, C.; HORNING, R.L.; QUEZADO, M.; YANG, Z.; NEURATH, M.F.; SALFELD, J.; VELDMAN, G.M.; SCHWERTSCHLAG, U.; STROBER, W. Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. **N Engl J Med.**, v. 351, n. 20, p. 2069-79, 2004.

MARQUES, V.P.; GONÇALVES, G.M.; FEITOZA, C.Q.; CENEDEZE, M.A.; FERNANDES BERTOCCHI, A.P.; DAMIÃO, M.J.; PINHEIRO, H.S.; ANTUNES TEIXEIRA, V.P.; DOS REIS, M.A.; PACHECO-SILVA, A.; SARAIVA CÂMARA, N.O. Influence of TH1/TH2 switched immune response on renal ischemia-reperfusion injury. **Nephron Exp Nephrol**, v. 104, n. 1, p. e48-56, 2006.

MARTIN, G.R.; WALLACE, J.L. Gastrointestinal inflammation: a central component of mucosal defense and repair. *Exp Biol Med*, v. 231, n. 2, p. 130-7, 2006.

MARTINOLLE, J.P.; GARCIA-VILLAR, R.; FIORAMONTI, J.; BUENO, L. Altered contractility of circular and longitudinal muscle in TNBS-inflamed guinea pig ileum. **Am J Physiol.**, v. 272(5 Pt 1), p. G1258-67, 1997.

MARTINOLLE, J.P.; GARCIA-VILLAR, R.; MORE, J.; BUENO, L. Evidence for mast cell, leukotriene and nitric oxide involvement in the regulation of the adrenoceptor number of inflamed small intestine in guinea pigs. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 7, n. 3, p. 187-95, 1995.

MAZZON, E.; SAUTEBIN, L.; CAPUTI, A.P.; CUZZOCREA, S. 5-lipoxygenase modulates the alteration of paracellular barrier function in mice ileum during experimental colitis. **Shock**, v. 25, n. 4, p. 377-83, 2006.

MCALINDON, M.E.; HAWKEY, C.J.; MAHIDA, Y.R. Expression of interleukin 1 β and interleukin 1 β converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 42, p. 214–219, 1998.

MCGUIRK, P.; MILLS, K.H.G. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 9, 2002.

MCINTYRE, T.M.; ZIMMERMAN, G.A.; PRESCOTT, S.M. Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 7, p. 2204-8, 1986.

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

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Drug design based on natural products. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, 2001.

MONTECUCCO, F.; STEFFENS, S.; BURGER, F.; DA COSTA, A.; BIANCHI, G.; BERTOLOTTI, M.; MACH, F.; DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. **Cell Signal**, v. 20, n. 3, p. 557-68, 2008.

MONTRUCCHIO, G.; SAPINO, A.; BUSSOLATI, B.; RIZEA-SAVU, S.; SILVESTRO, L.; LUPIA, E.; CAMUSSI, G. Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer. **Am. J. Pathol.**, v. 153, p. 1589-1596, 1998.

MOREELS, T.G.; DE MAN, J.G.; DICK, J.M.; NIEUWENDIJK, R.J.; DE WINTER, B.Y.; LEFEBVRE, R.A.; HERMAN, A.G.; PELCKMANS, P.A. Effect of TNBS-induced morphological changes on pharmacological contractility of the rat ileum. **Eur J Pharmacol**, v. 423, n. (2-3), p. 211-22, 2001.

MORTON, C.L.; WADKINS, R.M.; DANKS, M.K.; POTTER, P.M. The anticancer prodrug CPT-11 is a potent inhibitor of acetylcholinesterase but is rapidly catalyzed to SN-38 by butyrylcholinesterase. **Cancer Res.**, v. 59, p. 1458-1463, 1999.

MULÈ, F.; AMATO, A.; BALDASSANO, S.; SERIO, R. Evidence for a modulatory role of cannabinoids on the excitatory NANC neurotransmission in mouse colon. **Pharmacol Res.**, v. 56, n. 2, p. 132-9, 2007.

MUROHISA, G.; KOBAYASHI, Y.; KAWASAKI, T.; NAKAMURA, S.; NAKAMURA, H. Involvement of platelet activating factor in hepatic apoptosis and necrosis in chronic ethanol-fed rats given endotoxin. **Liver**, v. 22, p. 394-403, 2002.

MYERS, B.S.; DEMPSEY, D.T.; YASAR, S.; MARTIN, J.S.; PARKMAN, H.P.; RYAN, J.P. Acute experimental distal colitis alters colonic transit in rats. **J Surg Res**, v. 69, n. 1, p. 107-12, 1997.

NAKANISHI, K.; YOSHIMOTO, T.; TSUTSUI, H.; OKAMURA, H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 423–74, 2001.

NASSER, Y.; FERNANDEZ, E.; KEENAN, C.M.; HO, W.; OLAND, L.D.; TIBBLES, L.A.; SCHEMANN, M.; MACNAUGHTON, W.K.; RÜHL, A.; SHARKEY, K.A. Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 291, n. 5, p. G912-27, 2006.

NATHAN, C.; XIE, Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, p. 915, 1994.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J Clin Invest**, v. 100, n. 10, p. 2417–2423, 1997.

NEURATH, M.F.; FUSS, I.; KELSALL, B.L.; STUBER E.; STROBER, W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **J Exp. Med.**, v. 182, p. 1281-1290, 1995.

NIEDBALA, W.; CAI, B.; LIEW, F.Y. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. **Ann Rheum Dis**, v. 65(Suppl III), p. iii37–iii40, 2006.

NOVICK, D.; KIM, S.H.; FANTUZZI, G.; REZNIKOV, L.L.; DINARELLO, C.A.; RUBINSTEIN, M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. **Immunity**, v. 10, p. 127–36, 1999.

NUSRAT, A.; TURNER, J.R.; MADARA, J.L. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, p. G851-857, 2000.

OBERLIES, N.H.; KROLL, D.J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.2, p.129-135, 2004.

ÖHD, J.F.; WIKSTROM, K.; SJOLANDER, A. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 119, p. 1007-1018, 2000.

OKAMURA, H.; TSUTSI, H.; KOMATSU, T. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. **Nature**, v. 378, p. 88–91, 1995.

OLIVEIRA, S.H.; CANETTI, C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. Neutrophil Migration Induced by IL-1beta Depends upon LTB(4) Released by Macrophages and upon TNF-alpha and IL-1beta Released by Mast Cells. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 36-46, 2008.

PATERSON, W.G.; KIEFFER, C.A.; FELDMAN, M.J.; MILLER, D.V.; MORRIS, G.P. Role of platelet-activating factor in acid-induced esophageal mucosal injury. **Dig Dis Sci.**, v. 52, n. 8, p. 1861-6, 2007.

PEPLOW, P.V. Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 61, n. 2, p. 65-82, 1999.

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. 2849-2855, 2004.

PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T.G. 5-Lipoxygenase and FLAP. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 69, p. 99-109, 2003.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W.R. Leukotrienes. **N Engl J Med**, v. 357, p. 1841, 2007.

PLUJÀ, L.; FERNÁNDEZ, E.; JIMÉNEZ, M. Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. **Br J Pharmacol**, v. 12, p. 883-892, 1999.

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, n. 7, p. 806-11, 2002.

POTOKA, D.A.; UPPERMAN, J.S.; ZHANG, X.R.; KAPLAN, J.R.; COREY, S.J.; GRISHIN, A.; ZAMORA, R.; FORD, H.R. Peroxynitrite inhibits enterocyte proliferation and modulates Src kinase activity in vitro. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 285, n. 5, p. G861-9, 2003.

PRESCOTT, S.M.; ZIMMERMAN, G.A.; STAFFORINI, D.M.; MCINTYRE, T.M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 419-45, 2000.

RADOJEVIC, N.; MCKAY, D.M.; MERGER, M.; VALLANCE, B.A.; COLLINS, S.M.; CROITORU, K. Characterization of enteric functional changes evoked by in vivo anti-CD3 T cell activation. **Am J Physiol**, v. 276, p. R715-23, 1999.

RAGGERS, R.J.; VOGELS, I.; VAN MEER, G. Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. **Biochem J**, v. 357, p. 859-65, 2001.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Semin Immunol**, v. 13, n. 4, p. 219-27, 2001.

RIAZ, A.A.; SCHRAMM, R.; SATO, T.; MENGER, M.D.; JEPPSSON, B.; THORLACIUS, H. Oxygen radical-dependent expression of CXC chemokines

regulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion in the mouse colon. **Free Radic Biol Med.**, v. 35, n. 7, p. 782-9, 2003.

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.

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

ROTH BJ, SLEDGE GWJ, WILLIAMS SD, MEYER SC, ANSARI R, FISHER WB. Methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in metastatic. **Cancer**, 68(2):248-252, 1991.

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

SAKAMOTO, H.; TOSAKI, T.; NAKAGAWA, Y. Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase modulates acetyl-CoA: 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase activity. **J Biol Chem**, v. 277, p. 50431-8, 2002.

SALA, A.; ZARINI, S.; BOLLA, M. Leukotrienes: Lipid bioeffectors of inflammatory reactions. **Biochemistry**, v. 63, p. 84-92, 1998.

SALTZ, L.B.; COX, J.V.; BLANCKE, C. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. **EnglJMed**, v. 343, p. 905-14, 2000.

SANDBORN, W.J.; HANAUER, S.B. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. **Inflamm. Bowel Dis**, v. 5, p. 119-133, 1999.

SANTUCCI, L.; WALLACE, J.; MENCARELLI, A.; FARNETI, S.; MORELLI, A.; FIORUCCI, S. Different sensitivity of lamina propria T-cell subsets to nitric oxide-induced apoptosis explains immunomodulatory activity of a nitric oxide-releasing derivative of mesalamine in rodent colitis. **Gastroenterology**, v. 128, n. 5, p. 1243-57, 2005.

SARTOR, R.B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-94, 2008.

SCHAEFER, K.L.; DENEVICH, S.; MA, C.; COOLEY, S.R.; NAKAJIMA, A.; WADA, K.; SCHLEZINGER, J.; SHERR, D.; SAUBERMANN, L.J. Intestinal antiinflammatory effects of thiazolidenedione peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands on T helper type 1 chemokine regulation include nontranscriptional control mechanisms. **Inflamm Bowel Dis**, v. 11, n. 3, p. 244-52, 2005.

SCHMITZ, J. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, p. 479-490, 2005.

SCHMITZ, J.; OWYANG, A.; OLDHAM, E.; SONG, Y.; MURPHY, E.; MCCLANAHAN, T.K.; ZURAWSKI, G.; MOSHREFI, M.; QIN, J.; LI, X.; GORMAN, D.M.; BAZAN, J.F.; KASTELEIN, R.A. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity**, v. 23, p. 479-490, 2005.

SCHÖNBECK, U.; MACH, F.; LIBBY, P. Generation of biologically active interleukin-1h by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of interleukin-1h processing. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3340-3346, 1998.

SCHULZE-KOOPS, H.; KALDEN, J.R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 15, n. 5, p. 677-91, 2001.

SCOTT, R.B.; MARIC, M. A limited role for leukotrienes and platelet-activating factor in food protein induced jejunal smooth muscle contraction in sensitized rats. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 69, n. 12, p. 1841-6, 1991.

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

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

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

SHAH, V.; LYFORD, G.; GORES, G.; FARRUGIA, G. Nitric Oxide in Gastrointestinal Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 126, p. 903-913, 2004.

SIMPSON, S.J.; SHAH, S.; COMISKEY, M.; DE JONG, Y.P.; WANG, B.; MIZOGUCHI, E.; BHAN, A.K.; TERHORST, C. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon γ expression by T cells. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 1225-1234, 1998.

SHAHBAZIAN, A.; HEINEMANN, A.; PESKAR, B.A.; HOLZER, P. Differential peristaltic motor effects of prostanoid (DP, EP, IP, TP) and leukotriene receptor agonists in the guinea-pig isolated small intestine. **Br J Pharmacol**, v. 137, n. 7, p. 1047-54, 2002.

SIEGMUND, B.; LEHR, H.-A.; FANTUZZI, G.; DINARELLO, C.A. IL-1 β -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 13249–13254, 2001.

SOARES PM, MOTA JM, GOMES AS, OLIVEIRA RB, ASSREUY AM, BRITO GA, SANTOS AA, RIBEIRO RA, SOUZA MH. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2008 Mar 7 [Epub ahead of print]

SONIS ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. **Oral Oncology** 34:39-43, 1998.

SONIS ST. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**. 4(4):277–284, 2004.

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

SONIS ST, FEY EG. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**,16: 680–686, 2002.

SONIS, S.T.; PETERSON, R.L.; EDWARDS, L.J. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters, **Oral Oncol**, v. 36, n. 4, p. 373–381, 2000.

SOUZA-FILHO, M.V.; LIMA, M.V.; POMPEU, M.M.; 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.

SOUZA, M.H.; TRONCON, L.E.; CUNHA, F.Q.; OLIVEIRA, R.B. Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin- induced gastric damage in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 10, p. 1383-1390, 2003.

SPILLER, R.C.; JENKINS, D.; THORNLEY, J.P.; HEBDEN, J.M.; WRIGHT, T.; SKINNER, M.; NEAL, K.R. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter*

enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. **Gut**, v. 47, p. 804-811, 2000.

STAFFORINI, D.M.; MCINTYRE, T.M.; CARTER, M.E.; PRESCOTT, S.M. Human plasma plateletactivating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. **J Biol Chem**, v. 262, p. 4215-22, 1987.

STURM, A.; DIGNASS, A.U. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. **Biochim Biophys Acta.**, v. 23, n. 1582(1-3), p. 282-8, 2002.

SUGAWARA, S.; UEHARA, A.; NOCHI, T.; YAMAGUCHI, T.; UEDA, H.; SUGIYAMA, A.; HANZAWA, K.; KUMAGAI, K.; OKAMURA, H.; TAKADA, H. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. **J. Immunol.** v. 167, p. 6568– 6575, 2001.

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

TAKEUCHI, M.; NISHIZAKI, Y.; SANO, O.; OHTA, T.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells. **Cell Tissue Res**, v. 289, p. 499–503, 1997.

TALLMAN, M.N.; RITTER, J.K.; SMITH, P.C. Differential rates of glucuronidation for 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) lactone and carboxylate in human and rat microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferase isoforms. **Drug Metab Dispos.**, v. 33, n. 7, p. 977-83, 2005.

TAN-NO, K.; NIIJIMA, F.; NAKAGAWASAI, O.; SATO, T.; SATOH, S.; TADANO, T. Development of tolerance to the inhibitory effect of loperamide on gastrointestinal transit in mice. **Eur J Pharm Sci.**, v. 20, n. 3, p. 357-63, 2003.

TEPPERMAN, B.L.; BROWN, J.F.; WHITTLE, B.J. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 265, p. G214-218, 1993.

THORNBERRY, N.A.; BULL, H.G.; CALAYCAY, J.R.; CHAPMAN, K.T.; HOWARD, A.D.; KOSTURA, M.J.; MILLER, D.K.; MOLINEAUX, S.M.; WEIDNER, J.R.; AUNINS, J. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. **Nature**, v. 356, p. 768-774, 1992.

TOMINAGA S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. **FEBS Lett**, v. 258, p. 301–304, 1989.

TORNBLOM, H.; LINDBERG, G.; NYBERG, B.; VERESS, B. Full-thickness biopsy of the jejunum reveals inflammation and enteric neuropathy in irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v. 123, n. 6, p. 1972-9, 2002.

UNNO, N.; WANG, H.; MENCONI, M.J.; TYTGAT, S.; LARKIN, V.; SMITH, M.; MORIN, M.J.; CHAVEZ, A.; HODIN, R.; FINK, M.P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1246-11257, 1997.

VALLANCE, B.A.; CROITORU, K.; COLLINS, S.M. T lymphocyte-dependent and -independent intestinal smooth muscle dysfunction in the T. spiralis-infected mouse. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 275, p. G1157-1165, 1998.

VEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, 2006.

VON BÜLTZINGSLÖWEN, I.; BRENNAN, M.T.; SPIJKERVET, F.K.; 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, n. 6, p. 519-27, 2006.

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

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 3, p. 349-74, 2000.

WALLACE, J.L.; BRAQUET, P.; IBBOTSON, G.C.; MACNAUGHTON, W.K.; CIRINO, G. Assessment of the role of platelet-activating factor in an animal model of inflammatory bowel disease. **J Lipid Mediat**, v. 1, n. 1, p. 13-23, 1989.

WANG, J.C. DNA topoisomerases. **Annu. Rev. Biochem.** v. 65, p. 635–692, 1996.

WERENSKIOLD, A.K.; HOFFMANN, S.; KLEMENZ, R. Induction of a mitogen-responsive gene after expression of the Ha-ras oncogene in NIH 3T3 fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 9, p. 5207–5214, 1989.

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

XU, D. Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. **J Exp Med**, v. 187, p. 787–794, 1998.

XU, D.Z.; LU, Q.; DEITCH, E.A. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. **Shock**, v. 17, p. 139-145, 2002.

YE, X.J.; TANG, B.; MA, Z. The role of interleukin-18 in collagen-induced arthritis in the BB rat. **Clin Exp Immunol**, v. 136, p. 440–7, 2004.

YOSHIKAWA, S.; FUKUNAGA, Y.; TAKEUCHI, T.; NISHIO, H.; HATA, F. Modulation of acetylcholine release from the myenteric plexus of guinea-pig ileum by 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. **Eur J Pharmacol**, v. 239, n. (1-3), p. 261-4, 1993.

YOSHIMOTO, T.; MIZUTANI, H.; TSUTSUI, H.; NOBEN-TRAUTH, N.; YAMANAKA, K.; TANAKA, M.; IZUMI, S.; OKAMURA, H.; PAUL, W.E.; NAKANISHI, K. IL-18 induction of IgE: dependence on CD4+ T cells, IL-4 and STAT6. **Nat Immunol**, v. 1, p. 132–137, 2000.

ZIZZO, M.G.; MULÈ, F.; SERIO, R. Functional evidence for GABA as modulator of the contractility of the longitudinal muscle in mouse duodenum: role of GABA(A) and GABA(C) receptors. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 8, p. 1685-90, 2007.