

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA

**EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DE TNF- α E COX-2 NAS MUCOSITES
ORAL E INTESTINAL INDUZIDAS POR 5-FLUOROURACIL
E METOTREXATO EM ANIMAIS**

VILMA DE LIMA

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e
Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do
Ceará como pré-requisito para a obtenção do título de
Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gerly A. C. Brito

Fortaleza – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA

**EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DE TNF- α E COX-2 NAS MUCOSITES
ORAL E INTESTINAL INDUZIDAS POR 5-FLUOROURACIL
E METOTREXATO EM ANIMAIS**

Aprovada com Louvor

Fortaleza, 19 de Janeiro de 2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro (Orientador)

Paola Frassinete Torres Costa (UNIFOR)

José Hermênio C. Lima Filho (UFSC)

Aldo Ângelo Moreira Lima (UFC)

Marcellus H. L. Ponte Souza (UFC)

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA
da Universidade Federal do Ceará - UFC

Especialmente, à minha família, Cíntia, Saul e
Apparecida,
pelo imenso incentivo, carinho e companheirismo.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Dr. Ronaldo A. Ribeiro e à minha co-orientadora Professora Dra. Gerly A. C. Brito, pelos exemplos de dedicação à pesquisa, motivos de suas orientações seguras e comprometidas,

Aos Professores Dr. Aldo Ângelo M. Lima e Dr. Fernando Q. Cunha, por suas valiosas contribuições nesse estudo,

Ao Professor Dr. Manoel Odorico de Moraes, por sua disponibilidade e atenção peculiares,

A todos os professores da pós-graduação em farmacologia que contribuíram em minha formação científica nesse curso, especialmente ao professor Carlos Alberto Flores (in memoriam), meu eterno orientador,

Ao Professor Dr. Raimundo N. Costa, por sua dedicação e amizade sincera,

À amiga Laura Andréa, pela inestimável colaboração nas análises das úlceras gástricas,

Às amigas Sandra Nunes Monteiro e Ludermiller Saboia, pela cumplicidade em nossos estudos de mucosite,

A todos os colegas do laboratório LAFICA, especialmente Renata Leitão, Carlos Rocha, Mirna Bezerra, Adriana Magalhães, Virgínia Girão, Pedro Adriano e demais colegas da pós-graduação, pela agradável convivência e solidariedade,

Aos estudantes de Iniciação Científica que contribuíram de forma muito importante: Christine Gurgel, Breno Falcão, Rômulo Augusto, Ianne Lima, Daniel Holanda, Moysés Souza, Bruno Leitão e Hellíada Vasconcelos,

Aos técnicos Maria Silvandira (Vandinha), por sua dedicação e carinho em tudo o que realiza e Ivan, por sua atenção na confecção das lâminas histológicas.

Aos funcionários e prestadores de serviços do Departamento de Farmacologia, Sílvia, Aura, Haroldo, Fernando e Rose,

À Dra. Artemísia e ao Sr. Bento, pela atenção dispensada às solicitações ao biotério,

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ l	microlitro
5-FU	Fluorouracil
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
Anova	Análise de variância
CEME	Central de medicamentos do Brasil
CLX	Celecoxib
COX	Ciclooxigenase
DHFR	Enzima diidrofolato redutase
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTMP	Timidina monofosfato
DUMP	Deoxiuridina monofosfato
epm	Erro padrão da média
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
G-CSF	Fator estimulador de crescimento de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos/ monócitos
H&E	Hematoxilina e eosina
HPLC-PAD	Cromatografia líquida de alta performance com detecção amperométrica pulsada
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL-	Interleucina
IL-1ra	Antagonista de receptor da IL-1
IND	Indometacina
INF-	Interferon
ip	Via intra-peritoneal

kg	Kilograma
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
Me	Mediana
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MTX	Metotrexato
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
PAF	Fator ativador de plaquetas
PCOX-	Proteína COX-parcial
PDE	Fosfodiesterase
PG	Prostaglandina
PGI ₂	Prostaciclina
PMN	Polomorfonucleares
PTX	Pentoxifilina
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
sc	Via subcutânea
TGF	Fator transformador de crescimento
TLD	Talidomida
TM	Trauma mecânico
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano

RESUMO

Evidências da participação de TNF- α e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato em animais - VILMA DE LIMA. Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Aprovação com Louvor em 19 de janeiro de 2004. Orientador: Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

A mucosite é caracterizada por úlceras e sintomas orais e intestinais causados por drogas citotóxicas, onde prostaglandinas (PG) e citocinas podem exercer efeitos pró-inflamatórios. O objetivo desse estudo foi verificar os efeitos do celecoxib (CLX) e indometacina (IND), inibidores da síntese de PG, e de pentoxifilina (PTX) e talidomida (TLD), inibidores da síntese de citocinas, em mucosites induzidas por antineoplásicos. Injetou-se 5-fluorouracil (FU 60 e 40 mg/kg-ip) em hamsters *Golden* machos, para a mucosite oral (MO); e metotrexato (MTX 2,5 mg/kg-sc) em ratos *Wistar* e em camundongos *C57* machos, para a mucosite intestinal (MI). Grupos de hamsters com MO foram tratados sc com CLX (7,5, 15 ou 30 mg/kg), IND (0,25, 0,5 ou 1 mg/kg), PTX (5, 15 ou 45 mg/kg) ou TLD (10, 30 ou 90 mg/kg) diariamente durante 10 d e avaliados os seguintes parâmetros: análises macroscópica e histopatológica, atividade da mieloperoxidase (MPO), leucograma e variação de massa corpórea. O FU causou pico das ulcerações e abscessos no 10º dia ($P < 0,05$), sendo confirmado pela análise histológica e atividade da MPO. Observou-se leucocitose, às custas de neutrófilos, e perda acentuada de massa corpórea. CLX (7,5 e 15 mg/kg), mas não IND, reduziu as úlceras e abscessos (66,6%), a leucocitose e a perda de peso. No entanto, CLX 30 mg/kg apresentou perda de eficácia antiinflamatória, causando aumento da mucosite oral. PTX (45 mg/kg) e TLD (90 mg/kg) reduziram a intensidade dos achados (66,6%), diminuindo as ulcerações e abscessos no 10º dia. Apenas PTX reduziu a leucocitose induzida pela mucosite oral induzida. Na mucosite intestinal, ratos foram tratados ip com CLX (7,5, 15 ou 30 mg/kg), PTX (15, 30 ou 60 mg/kg) ou TLD (10, 30 ou 90 mg/kg) durante 5 dias, e avaliados pela análise morfométrica, permeabilidade intestinal via teste da lactulose e manitol, imunohistoquímica para detecção de TNF- α , leucograma e variações de massa corpórea, de ingestões de líquidos e alimentos dos animais. O MTX causou encurtamento dos vilos, aumento da profundidade das criptas, e perda da integridade do epitélio, com conseqüente redução da área absortiva intestinal, principalmente no duodeno, seguido pelo jejuno e em menor grau, no íleo. Observou-se leucopenia no 5º dia, além de redução de massa corpórea e das ingestões de líquidos e alimentos. CLX (30 mg/kg) preveniu a redução da área absortiva duodenal em 37%, além de diminuir a leucopenia. Não reduziu, porém, a perda de peso, nem alterou as ingestões de líquidos ou alimentos. PTX (15 mg/kg) foi capaz de inibir a redução da relação vilos/criptas em 38% no duodeno, com diminuição da solução de continuidade do epitélio, do infiltrado inflamatório e conseqüente proteção da área absortiva. Apesar de não ter prevenido a leucopenia ou as baixas ingestões de líquidos e alimentos, PTX foi capaz de reduzir a perda de massa corpórea significativamente. TLD (30 e 90 mg/kg) reduziu em 37% e 29%, respectivamente, a relação vilos/criptas duodenais induzida por MTX. TLD (90 mg/kg) causou redução significativa da marcação de TNF- α tanto ao nível de epitélio como na lâmina própria, quando comparado a mucosite não tratada. Entretanto, TLD não reduziu a leucopenia vista no 5º dia, nem preveniu a redução de massa corpórea e ingestões de líquidos ou alimentos. Camundongos *C57BL/6 knockout* para receptor R1 de TNF- α (TNF-R1-/-) apresentam relação vilos/criptas reduzida em relação a animais normais. Estes foram submetidos a MI por MTX e mostraram menores alterações ao nível de jejuno e íleo. Assim, os resultados demonstraram que os modelos animais de mucosites oral e intestinal reproduziram importantes aspectos dessa patologia em humanos. PTX e TLD e em menor grau, CLX, reduziram a inflamação nas mucosas induzidas por antineoplásicos, sugerindo-se que o TNF- α possa ser um mediador importante nas mucosites, enquanto que as prostaglandinas possuem uma função dependente de sua concentração.

ABSTRACT

Evidences of TNF- α and COX-2 participation in the oral and intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil and metotrexato in animals - VILMA DE LIMA. Thesis submitted as a partial fulfillment of the requirement to degree of Doctor's title in Pharmacology of the Department of Physiology and Pharmacology of the Medicine Faculty of the Ceará Federal University. Defense date: 2004, January 19. Supervisor: Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

The mucositis is characterized by ulcers, oral and intestinal symptoms caused by cytotoxic drugs, where prostaglandins (PG) and cytokines can cause pro-inflammatory effects. The objective of this study was to verify the effects of celecoxib (CLX) and indomethacin (IND), inhibitors of prostaglandin synthesis, and of pentoxifylline (PTX) and thalidomide (TLD), cytokine synthesis inhibitors, in mucositis induced by antineoplastic. It was injected 5-fluorouracil (5-FU 60 and 40 mg/kg-ip) in male Golden hamsters, to the oral mucositis (OM), or methotrexate (MTX 2,5 mg/kg-sc) in male Wistar rats and C57 mice, to the intestinal mucositis (IM). Hamster groups with OM were treated sc with CLX (7,5, 15 or 30 mg/kg), IND (0,25, 0,5 or 1 mg/kg), PTX (5, 15 or 45 mg/kg) or TLD (10, 30 or 90 mg/kg) daily during 10d and the following parameters were measured: macroscopic and histopathological analyses, myeloperoxidase activity (MPO), leucogram and body mass variation. The 5-FU caused maximum ulcerations and abscesses in the 10th day ($P < 0,05$). That was confirmed by histological analysis, MPO activity. Leukocytosis, created by neutrophilia, was observed along with accentuated body mass loss. CLX (7,5 and 15 mg/kg), instead of the IND, reduced the ulcers and abscesses (66,6%), the leukocytosis and the weight loss. However, CLX 30 mg/kg presented low anti-inflammatory effectiveness, resulting in an increase of the oral mucositis. PTX (45 mg/kg) and TLD (90 mg/kg) both reduced the intensity of the results by 66,6%. PTX was the only one able to reduce the leukocytosis induced by oral mucositis. For intestinal mucositis, rats were treated ip with CLX (7,5, 15 or 30 mg/kg), PTX (15, 30 or 60 mg/kg) or TLD (10, 30 or 90 mg/kg) daily during 5d, and studied by the morphometric analysis, intestinal permeability for the lactulose and mannitol test, immunohistochemistry for TNF- α detection, leucogram and body mass, ingestions of liquids and food variations of the animals. MTX caused shortening of the villi, increased depth of the crypts, and epithelium integrity loss, with consequent reduction of the absorptive intestinal area, mainly in the duodenum, in the jejunum, and in smaller degree, in the ileum. Leucopenia was observed in the 5th day, followed by an accentuated weight loss and lower ingestions of liquid and food. CLX (30 mg/kg) prevented the reduction of the duodenal absorptive area in 37%, besides decreasing the leucopenia. However, it did not reduce the weight loss, neither the lowest ingestion of liquid and/or food. PTX (15 mg/kg) was capable to inhibit the reduction of the ratio villi/crypts in 38% in the duodenum, with decrease of the epithelium continuity, of the inflammatory infiltrate and consequent protection of the absorptive area. Even not preventing the leucopenia or the low ingestion of liquid and/or food, PTX was capable to reduce the weight loss. TLD (30 and 90 mg/kg) reduced by 37% and 29%, respectively, the shortening of the villi and increased the depth of the duodenal crypts induced by MTX, with smaller loss of epithelial absorptive area. TLD (90 mg/kg) caused a significant reduction of the TNF demarcation at the epithelium when compared to untreated mucositis. However, TLD didn't reduce the leucopenia observed in the 5th day, nor the weight loss or the low ingestion of liquid or food. C57BL/6 *knockout* mice to R1 TNF- α receptor (TNF-R1 $^{-/-}$) have a reduced ratio villi/crypts when compared to normal animals. They were submitted to a IM by MTX and showed minor alterations at the jejunum and ileum segments. In conclusion, the results showed that animal oral and intestinal mucositis reproduced important aspects of this pathology in humans. PTX and TLD, and minor grade, CLX, reduced the antineoplastic mucositis inflammation, suggesting that TNF- α is an important mediator in mucositis, while prostaglandin possess function concentration dependents.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
1. Drogas antineoplásicas.....	6
1.1. Antimetabólitos.....	7
1.1.1. Fluorouracil.....	7
1.1.2. Metotrexato.....	10
2. Complicações do tratamento quimioterápico.....	13
2.1. Mucosite Oral.....	14
2.2. Mucosite Intestinal.....	20
3. Mediadores envolvidos nas Mucosites.....	25
3.1. Prostaglandinas e respostas inflamatórias.....	25
3.2. Citocinas e respostas inflamatórias.....	28
4. Mucosites induzidas por quimioterápicos antineoplásicos.....	32
5. Drogas utilizadas na abordagem farmacológica.....	33
5.1. Celecoxib.....	33
5.2. Indometacina.....	36
5.3. Pentoxifilina.....	38
5.4. Talidomida.....	41
6. Justificativas e objetivos.....	44
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
1. Animais.....	47
A. <i>Mucosite Oral Experimental</i>	47
B. <i>Mucosite Intestinal Experimental</i>	47
2. Drogas, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados.....	49
3. Protocolos experimentais.....	50

3.1. Modelo de mucosite oral induzida em hamsters.....	50
3.1.1. Grupos experimentais.....	52
A. Grupos controle.....	52
B. Grupo tratado com celecoxib.....	52
C. Grupo tratado com indometacina.....	52
D. Grupo tratado com pentoxifilina.....	53
E. Grupo tratado com talidomida.....	53
3.1.2. Parâmetros avaliados.....	53
3.1.2.1. Análise da estrutura das mucosas jugais.....	53
A. Análise macroscópica das mucosas jugais.....	53
B. Análise histopatológica das mucosas jugais.....	54
C. Dosagem da mieloperoxidase.....	55
3.1.2.2. Análise das alterações sistêmicas dos animais.....	56
A. Análise da variação de massa corpórea.....	56
B. Estudo hematológico.....	56
C. Estudo das mucosas gástricas.....	56
3.2. Modelo de mucosite intestinal induzida em ratos.....	57
3.2.1. Grupos experimentais.....	59
A. Grupos controle.....	59
B. Grupo tratado com celecoxib.....	59
C. Grupo tratado com pentoxifilina.....	59
D. Grupo tratado com talidomida.....	60
3.1.2. Parâmetros avaliados.....	60
3.1.2.1. Análise da estrutura das mucosas intestinais.....	60
A. Análise morfométrica.....	60
B. Análise da permeabilidade intestinal pelo teste lactulose e manitol.....	61
C. Estudo imunohistoquímico para detecção de TNF- α	61
3.1.2.2. Análise das alterações sistêmicas dos animais.....	62
A. Análise da variação de massa corpórea.....	62
B. Análise da variação da ingestão de líquidos.....	62
C. Análise da variação da ingestão de alimentos.....	62
D. Estudo hematológico.....	63

3.3. Modelo de mucosite intestinal induzida em camundongos Knockout para o Receptor 1 de TNF- α	63
4. Análise estatística.....	64

IV. RESULTADOS.....65

PARTE A

1. Mucosite oral induzida em hamsters.....	66
1.1. Efeito do 5-fluorouracil sobre as mucosas jugais.....	66
1.2. Efeito do 5-fluorouracil sobre o estudo histopatológico das mucosas jugais.....	68
1.3. Efeito do 5-fluorouracil sobre a dosagem de mieloperoxidase das mucosas jugais.....	71
1.4. Efeito do 5-fluorouracil sobre o leucograma dos hamsters.....	71
1.5. Efeito do 5-fluorouracil sobre a variação de massa corpórea dos hamsters.....	71
2. Efeito dos tratamentos nos grupos experimentais.....	75
2.1. Tratamento com celecoxib.....	75
2.1.1. Efeito do celecoxib sobre a mucosite oral dos hamsters.....	75
2.1.2. Efeito do celecoxib sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters.....	78
2.1.3. Efeito do celecoxib sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.....	78
2.1.4. Efeito do celecoxib sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral.....	82
2.1.5. Efeito do celecoxib sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral.....	82
2.1.6. Efeito do celecoxib sobre as úlceras das mucosas gástricas de animais submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil.....	82
2.2. Tratamento com indometacina.....	87
2.2.1. Efeito da indometacina sobre a mucosite oral dos hamsters.....	87
2.2.2. Efeito da indometacina sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters.....	87

2.2.3. Efeito da indometacina sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.....	90
2.2.4. Efeito da indometacina sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral.....	90
2.2.5. Efeito da indometacina sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral.....	90
2.3. Tratamento com pentoxifilina.....	94
2.3.1. Efeito da pentoxifilina sobre a mucosite oral dos hamsters.....	94
2.3.2. Efeito da pentoxifilina sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters.....	94
2.3.3. Efeito da pentoxifilina sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.....	97
2.3.4. Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral.....	97
2.3.5. Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral.....	97
2.4. Tratamento com talidomida.....	101
2.4.1. Efeito da talidomida sobre a mucosite oral dos hamsters.....	101
2.4.2. Efeito da talidomida sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters.....	101
2.4.3. Efeito da talidomida sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters.....	104
2.4.4. Efeito da talidomida sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral.....	104
2.4.5. Efeito da talidomida sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral.....	104

PARTE B

1. Mucosite intestinal induzida em ratos.....	108
1.1. Efeito do metotrexato sobre as mucosas intestinais.....	108
1.2. Efeito do metotrexato sobre a permeabilidade intestinal dos ratos.....	111
1.3. Efeito do metotrexato sobre o leucograma dos ratos.....	111

1.4. Efeito do metotrexato sobre a variação de massa corpórea dos ratos.....	111
1.5. Efeito do metotrexato sobre a variação de ingestão de líquidos dos ratos.....	115
1.6. Efeito do metotrexato sobre a variação de ingestão de alimentos dos ratos.....	115
1.7. Efeito do metotrexato sobre a imunohistoquímica para detecção de TNF- α	115
2. Efeito dos tratamentos farmacológicos nos grupos experimentais.....	119
2.1. Tratamento com celecoxib.....	119
2.1.1. Efeito do celecoxib sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal por metotrexato.....	119
2.1.2. Efeito do celecoxib sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal.....	122
2.1.3. Efeito do celecoxib sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal.....	122
2.1.4. Efeito do celecoxib sobre os aspectos metabólicos dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato.....	123
2.2. Tratamento com pentoxifilina.....	127
2.2.1. Efeito da pentoxifilina sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal dos ratos.....	127
2.2.2. Efeito da pentoxifilina sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal.....	127
2.2.3. Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal.....	130
2.2.4. Efeito da pentoxifilina sobre os aspectos metabólicos dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato.....	130
2.3. Tratamento com talidomida.....	133
2.3.1. Efeito da talidomida sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal dos ratos.....	133
2.3.2. Efeito da talidomida sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal.....	133
2.3.3. Efeito da talidomida sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal.....	136

2.3.4. Efeito da talidomida sobre os aspectos metabólicos dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato.....	136
2.3.5. Imunohistoquímica para detecção de TNF- α em ratos com mucosite intestinal induzida por metotrexato e tratados com talidomida.....	139
3. Mucosite intestinal induzida em camundongos.....	141
3.1. Efeito do metotrexato sobre as alterações histopatológicas das mucosas intestinais dos camundongos.....	141
3.2. Efeito da deficiência do gene de TNF- α sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal dos camundongos.....	143
V. DISCUSSÃO.....	145
VI. CONCLUSÕES.....	180
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	182

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

As células que constituem os animais são formadas por três partes: a membrana celular, que é a parte mais externa da célula; o citoplasma, que constitui o corpo celular; e o núcleo, que contém cromossomas, os compostos gênicos (Figura 1). Toda a informação genética encontra-se inscrita nos genes, numa "memória química", o ácido desoxirribonucléico (DNA). Através do DNA, os cromossomas passam as informações necessárias para o funcionamento celular (Cooper 2000).

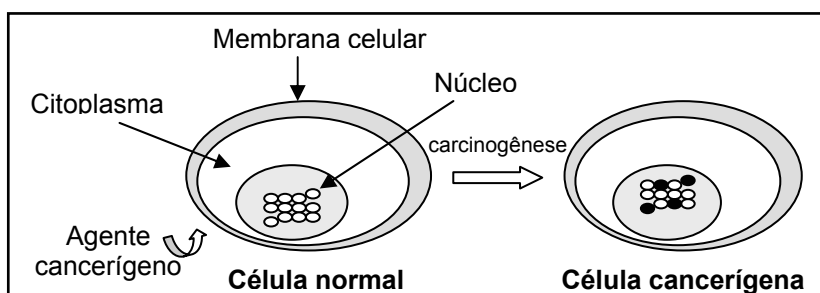


Figura 1: Desenho esquemático da gênese da célula cancerosa

Uma célula normal pode sofrer modificações no DNA dos genes. É o que chamamos mutação genética. As células, cujo material genético foi alterado, passam a receber instruções de maneira errada para exercerem as suas atividades. Tais alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados proto-oncogenes, que a princípio, são pouco ativos em células normais. Quando ativados de forma errônea, os proto-oncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferentes são denominadas cancerosas (Cooper 2000).

O câncer ou neoplasia maligna, portanto, é uma doença caracterizada por apresentar proliferação celular descontrolada; perda de função, devido à falta de propriedades de diferenciação celular; além de poder de invasão e capacidade de metastizar-se, isto é, disseminar-se para outras partes do corpo (Rang *et al.* 2003). Trata-se de uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, podendo-se

estimar que pelo menos um em cada cinco habitantes da Europa e da América do Norte irá morrer de câncer (Rang *et al.* 2003).

O Brasil apresenta um quadro sanitário em que se combinam doenças ligadas à pobreza, típicas dos países em crescimento, e doenças crônico-degenerativas, características dos países mais desenvolvidos. Essa situação reflete, inquestionavelmente, as contradições do processo de evolução do País.

Durante o século XX diversas modificações demográficas e econômicas ocorreram em nosso país, com conseqüências marcantes nas taxas de incidência, prevalência e mortalidade de várias doenças. As neoplasias malignas ocupam o terceiro lugar em óbitos por causas definidas, com 11,9% sobre o total de morte no Brasil, sendo precedidas apenas por doenças do aparelho circulatório e causas externas (INCa-MS 1996-2004).

A ocorrência estimada de óbitos por câncer para o ano de 2002 foi de 122.600 em todo o território brasileiro, representando uma taxa específica de mortalidade de 76,82 por 100.000 homens e 63,76 por 100.000 mulheres. De acordo com os Registros de Câncer de base populacional, as mais altas taxas entre homens encontram-se em Porto Alegre e Campinas, em seguida, em Fortaleza e Belém (INCa-MS 1996-2004). Nesse sentido, a prevenção e o diagnóstico oportuno são atualmente as medidas mais eficazes que se dispõe para melhorar o prognóstico do câncer. Os últimos anos testemunharam o aperfeiçoamento dos fármacos já existentes e o uso de novas drogas adjuvantes para vencer a resistência tumoral e minimizar as toxicidades farmacológicas. Estes fármacos, que vêm contribuindo para a eliminação e destruição das células neoplásicas, são descritos sob o amplo título de agentes antineoplásicos (Kowalski & Nishimoto 2000).

Neste contexto, ao mencionarmos a palavra – câncer, automaticamente remetemo-nos à idéia de uma doença fatal e, com isto,

receber tal diagnóstico, implica defrontar-se com um dos maiores medos da humanidade – a morte. As experiências relacionadas ao câncer são sempre negativas e o pensamento de que os tratamentos são arrasadores invadem as pessoas e geram emoções variadas. A maneira como reagimos às vicissitudes do cotidiano está relacionada aos nossos hábitos e às nossas crenças sobre o que somos, o que deveríamos ser e sobre como os outros poderiam ser. Entretanto, o paciente apenas recebe o diagnóstico e logo se depara com a necessidade de protocolos diversos de tratamentos, dentre os quais estão as quimioterapias.

O papel dos fármacos antineoplásicos na luta contra o câncer expandiu-se enormemente nestas últimas décadas. Estes agentes, como dito, são capazes de curar diversos tumores avançados e constituem o tratamento de escolha de numerosas neoplasias malignas amplamente disseminadas, as quais não podem ser alcançadas pela cirurgia ou estão além dos limites da radioterapia. São, também, utilizados como auxiliares de cirurgia e de irradiação na prevenção de metástases dos tumores primários tratados localmente (Calabresi & Chabner 2003).

Infelizmente, os agentes antineoplásicos não são específicos aos tumores e, portanto, destroem todas as células que estejam em divisão celular ativa. Desse modo, não só as células malignas, mas também as dos tecidos normais que proliferam rapidamente como os do trato gastrointestinal, tornam-se sujeitas às ações desses fármacos (Kwok & Schubert 2000).

II. REVISÃO DE LITERATURA

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Drogas antineoplásicas

O papel dos fármacos antineoplásicos na luta contra o câncer expandiu-se enormemente nestas últimas décadas. Estes agentes são capazes de curar diversos tumores avançados e constituem o tratamento de escolha de numerosas neoplasias malignas amplamente disseminadas, as quais não podem ser alcançadas pela cirurgia ou estão além dos limites da radioterapia. São, também, utilizados como auxiliares de cirurgia e de irradiação na prevenção de metástases dos tumores primários tratados localmente (Calabresi & Chabner 2003).

Tais drogas incluem os quimioterápicos tradicionais (isto é, agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos, esteróides, alcalóides vegetais e outros fármacos), os modificadores das respostas biológicas e os agentes utilizados especificamente para proteger o paciente dos efeitos tóxicos desses fármacos (Knox *et al.* 2000).

O objetivo da quimioterapia das neoplasias malignas consiste em erradicar células tumorais viáveis, sem lesar significativamente os tecidos normais do hospedeiro. Para que este fim seja alcançado, contudo, é necessário que o tumor seja sensível aos agentes antineoplásicos, que os sítios receptores nas células tumorais sejam expostos a concentrações adequadas de drogas ativas por um período suficiente de tempo, e que as células hospedeiras sejam resistentes aos efeitos desses agentes (Donehower *et al.* 1995).

As drogas antineoplásicas matam ou comprometem as células tumorais susceptíveis, por bloquear uma via metabólica ou bioquímica sensível à droga. Algumas, como os antimetabólitos, atuam por inibição da

duplicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e são mais eficazes contra as células em rápida divisão celular (Calabresi & Chabner 2003).

1.1. Antimetabólitos

Os antimetabólitos apresentam forte semelhança estrutural com o ácido fólico e as bases purina e pirimidina envolvidas na síntese de DNA, RNA e determinadas enzimas. Diferem, entretanto, no arranjo molecular do metabólito correspondente, em grau suficiente para atuarem como substratos falsos em reações bioquímicas, inibindo etapas de síntese ou incorporando-se em moléculas e interferindo na função ou replicação celular (Kwok & Schubert 2000).

Tipicamente, os antimetabólitos exercem seus principais efeitos durante a fase S (síntese de DNA) do ciclo celular. Por conseguinte, interferem no crescimento das células de rápida proliferação em todo o organismo – medula óssea, células germinativas, folículos pilosos e revestimento do trato gastrointestinal. Existem três classes de antimetabólitos, os análogos do ácido fólico, os análogos da purina e os análogos da pirimidina (Kwok & Schubert 2000).

Dentre esses diferentes fármacos, destacam-se o 5-fluorouracil, análogo da pirimidina, e o metotrexato, antagonista do ácido fólico, não apenas por serem drogas com as mais extensas histórias, mas principalmente, pela diversidade de usos terapêuticos aos quais se destinam e, conseqüentemente, seus variados efeitos colaterais.

1.1.1. Fluorouracil

O desenvolvimento de análogos das pirimidinas como agentes com potencial antineoplásico envolveu o pressuposto de que os ácidos nucleicos estão relacionados com o controle de proliferação celular. Assim, drogas

como o fluorouracil, exercem múltiplos efeitos sobre o crescimento celular anormal e estão, portanto, incluídas entre os fármacos de maior utilidade para o tratamento de tumores sólidos e leucemias (Pizzorno *et al.* 2000).

Adicionalmente, o fluorouracil possui atividade contra alterações malignas epiteliais, atingindo cânceres de mama, do trato gastrointestinal, de ovário e de cabeça e pescoço. Um conhecimento mais detalhado acerca de seu metabolismo intracelular tem favorecido, portanto, o interesse em combinações com moduladores bioquímicos, agentes que não possuem ou que apresentam apenas limitada atividade antineoplásica quando administrados isoladamente. No entanto, estes agentes aumentam o metabolismo ou os efeitos citotóxicos do fluorouracil, agindo em sinergismo com drogas como a cisplatina, o metotrexato e outros (Allegra & Greem 2001)

O fluorouracil (5-FU), uma pirimidina fluorada, é preparado a partir da substituição de um átomo de hidrogênio por outro mais estável de flúor na posição 5 da molécula de uracil (Figura 2). Este sítio específico de substituição no anel pirimidina foi selecionado porque ele pode inibir a subsequente conversão do nucleotídeo uracil em nucleotídeo timina (Pinedo & Peters 1988).

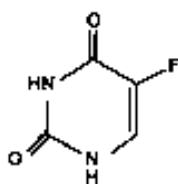


Figura 2: Estrutura da molécula do fluorouracil

Evidências experimentais têm sugerido numerosos sítios de ação do fluorouracil. A relativa importância de cada um varia amplamente entre os diferentes tecidos normais ou neoplásicos. Normalmente, os efeitos são divididos quanto às toxicidades direcionadas ao DNA ou ao RNA das células (Pizzorno *et al.* 2000).

Dessa forma, o fluorouracil, após a conversão intracelular em monofosfato de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FDUMP) atua como potente antimetabólito que se liga à timidilato sintetase, inibindo-a (McCarthy *et al.* 1998). Tal atividade resulta em inibição do ácido timidílico e comprometimento da síntese de DNA e, conseqüentemente, do crescimento celular. O metabolismo do fluorouracil também produz um intermediário crítico, o trifosfato de 5-fluorouridina (FUTP), que se incorpora no RNA e interfere na sua função. O FDUTP também pode incorporar-se ao DNA, produzindo quebras de filamento único que contribuem para a citotoxicidade (Pinedo & Peters 1988).

O fluorouracil é comumente administrado por via intravenosa, na forma de *bolus* ou como infusão contínua prolongada por alguns dias, durante um período de vários meses. A infusão contínua é vantajosa, visto que a meia-vida da droga é curta, dez a vinte minutos, e o fluorouracil, como outros antimetabólitos, atua na fase S do ciclo celular. Isto oferece maior oportunidade para as populações de células, que não se encontram na fase S, passarem para uma fase sensível (Allegra & Greem 1997).

Em virtude dos efeitos primários do fluorouracil serem exercidos em tecidos de rápida divisão celular, especialmente os das mucosas do trato gastrointestinal e medula óssea (McCarthy *et al.* 1998), seus efeitos adversos podem ser potencialmente fatais, sendo descrita, inclusive, a ocorrência de isquemia do miocárdio causada por vasoespasmos da artéria coronária. O espectro de toxicidades associadas com esse fármaco, tais como anorexia, vômitos, estomatite, mucosite e diarreia, varia consideravelmente de acordo com a dose, o esquema posológico adotado e a via de administração (Pizzorno *et al.* 2000).

1.1.2. Metotrexato

Os antagonistas do ácido fólico, frequentemente chamados de antifolatos, são drogas usadas como agentes antineoplásicos, antimicrobianos, antiinflamatórios e imunossupressores. Enquanto vários antagonistas do folato têm sido desenvolvidos e novos outros estão sob ensaios clínicos, o metotrexato (MTX) é o antifolato mais bem caracterizado e a mais versátil droga quimioterapêutica em uso na prática clínica (Kamen *et al.* 2000).

Assim, o metotrexato, um antimetabólico análogo 4-amino, 10-metil do ácido fólico (Figura 3), é um dos fármacos mais utilizados na quimioterapia do câncer. É uma droga essencial para pacientes com coriocarcinomas uterinos, leucemias, cânceres de mama, de urotélio e de cabeça e pescoço, linfomas e osteosarcomas (Allegra & Grem 1997).

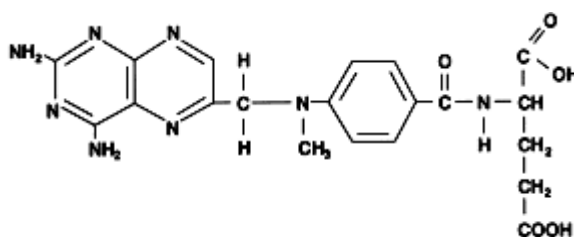


Figura 3: Estrutura da molécula do metotrexato

Além das indicações para tratamento das neoplasias malignas, os antifolatos também têm sido utilizados como abordagem terapêutica de doenças não malignas como psoríase, artrite reumatóide, doença *enxerto-versus-hospedeiro*, infecções bacterianas e parasitárias associadas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (Kamen *et al.* 2000).

Os antagonistas do folato são tidos como drogas citotóxicas que agem por interferirem em um ou mais passos de biossíntese que envolvem coenzimas de folato. Teoricamente, um análogo do folato pode funcionar por uma ou mais vias, como, por exemplo, competindo pela captação de folatos

para dentro das células, inibindo a formação dessas coenzimas ou, ainda, impedindo uma ou mais reações que são mediadas por coenzimas de folato (Rang *et al.* 2003).

Desse modo, o principal mecanismo de ação do metotrexato é a inibição competitiva da enzima diidrofolato redutase (DHFR), resultando na diminuição da conversão do diidrofolato (FH_2) em tetra-hidrofolato (FH_4), o qual seria doador metil e parcialmente oxidado durante a síntese *de novo* da timidina monofosfato (DTMP) a partir da deoxiuridina monofosfato (DUMP) (Figura 4).

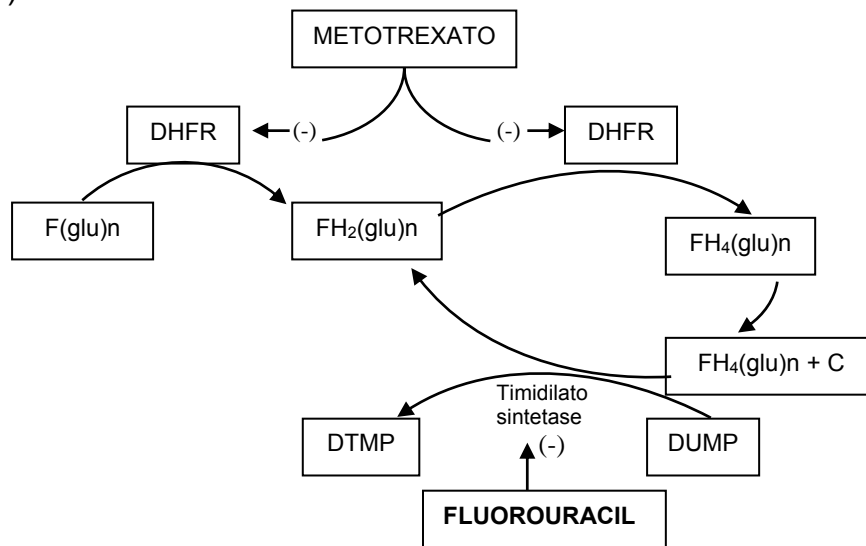


Figura 4: Diagrama simplificado da ação do metotrexato e do fluorouracil na síntese da timidilato. A poliglutamato tetraidrofolato $FH_4(glu)_n$ age como carreador de um unidade de carbono, fornecendo um grupo metil necessário para a conversão da 2'-deoxiuridilato (DUMP) para 2'-deoxitimidilato (DTMP) pela timidilato sintetase. Esta transferência de carbono resulta na oxidação do $FH_4(glu)_n$. Fluorouracil é convertido para FDUMP, o qual inibe a timidilato sintetase. (DHFR= diidrofolato redutase) (Rang *et al.* 2003).

A menor quantidade da conversão do diidrofolato em tetra-hidrofolato causa comprometimento da síntese do ácido timidílico e ácido inosínico. As deficiências desses ácidos retardam a síntese do DNA e RNA. A síntese das proteínas também é inibida, visto que os folatos reduzidos atuam como co-fatores na conversão da glicina em serina e da homocisteína em metionina (Bleyer 1978).

O metotrexato é facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal e excretado principalmente na urina. Portanto, na presença de insuficiência renal ocorre retenção da droga, o que conduz a sua rápida elevação sérica. Paralelamente, observa-se alguma reciclagem êntero-hepática da droga, causando um aumento em sua meia-vida de eliminação (Allegra & Grem 1997).

Este fármaco, apesar de não atravessar com facilidade a barreira hematoencefálica e por isso não atingir concentrações adequadas no líquido cefalorraquidiano (LCR), tende a distribuir-se nos “terceiros espaços”, como líquidos ascítico, pleural ou peritoneal. Estes locais atuam como reservatórios da droga. Portanto, a presença destas características clínicas ou de insuficiência renal contribui para o aumento da toxicidade do fármaco (Donehower *et al.* 1995).

Adicionalmente, o metotrexato se liga significativamente à albumina plasmática e, por isso, pode ser deslocado por algumas drogas como os salicilatos, sulfonamidas, diuréticos, hipoglicemiantes, difenilhidantoína, tetraciclina, cloranfenicol, ácido para-aminobenzóico e agentes antiinflamatórios ácidos. Preparações vitamínicas que contenham ácido fólico ou seus derivados podem, também, alterar as respostas ao metotrexato (Allegra & Grem 1997).

Os tecidos ativamente proliferativos, tais como os tumores malignos, as células fetais, do epitélio dérmico, da mucosa gastrintestinal e da bexiga, são os mais sensíveis aos efeitos desse agente. Como a proliferação celular nos tecidos malignos é maior que na maioria dos tecidos normais, é de se esperar que o metotrexato possa, portanto, impedir o crescimento tumoral sem causar danos irreversíveis às células do hospedeiro (Kamen *et al.* 2000).

Entretanto, os efeitos tóxicos primários da terapia com metotrexato consistem em mielossupressão, manifestada na forma de leucopenia e trombocitopenia, que podem resultar em infecção secundária e hemorragia, além de estomatite, faringite, esofagite e de mucosite gastrintestinal (Kwok & Schubert 2000).

A ocorrência desses efeitos adversos depende da dose, do esquema terapêutico e da via de administração da droga. A mucosite, em particular, é um importante efeito colateral e usualmente surge por volta de 3 a 7 dias após a terapia com metotrexato. Esta alteração, quando ocorre, é um sinal precoce de toxicidade, o que obriga a descontinuidade do tratamento quimioterápico (Kamen *et al.* 2000).

2. Complicações do tratamento quimioterápico

Os efeitos citotóxicos de várias drogas foram observados bem antes do início do século passado. Entretanto, foi apenas em meados da década de quarenta que a sua utilidade foi reconhecida no tratamento de neoplasias. A guerra química com mostarda de enxofre na Primeira Guerra Mundial, que resultou na diminuição dos linfonodos e tecidos mielóides nas vítimas, tornou-se um marco para a quimioterapia do câncer (Chabner *et al.* 2003).

Infelizmente, os agentes antineoplásicos não são específicos aos tumores e, portanto, destroem todas as células que estejam em divisão celular ativa. Desse modo, não só as células malignas, mas também as dos tecidos normais que proliferam rapidamente como os do trato gastrointestinal, medula óssea e folículos pilosos, tornam-se sujeitas às ações desses fármacos (Kwok & Schubert 2000).

Enquanto o manejo de diversas toxicidades relacionadas à quimioterapia, como a mielossupressão, náuseas e vômitos, tem evoluído, a incidência de mucosites, no entanto, tem aumentado. Este efeito colateral

consiste num processo inflamatório que acomete as mucosas orais e gastrointestinais, e pode ser considerado uma importante toxicidade limitante do uso de agentes citotóxicos antimetabólitos, tais como 5-fluorouracil, metotrexato e antagonistas de purinas. Antibióticos antitumorais, como doxorubicina, e outros agentes como hidroxiuréia e procarbazina, também causam tais alterações inflamatórias (Loprinzi *et al.* 1995, Berger & Kilroy 2001).

2.1. Mucosite Oral

As manifestações orais constituem um aspecto particularmente proeminente da toxicidade de agentes antineoplásicos, afetando a qualidade de vida, a habilidade de tolerar a quimioterapia e o custo geral do tratamento (Rubenstein 1998). As lesões eritematosas e ulcerativas causadas por fármacos estomatotóxicos produzem não apenas intenso desconforto, resultando em redução da ingestão de alimentos e líquidos, mas também, perda da integridade da mucosa. Com isto, favorece-se o aparecimento de infecções secundárias ou o risco de influxo sistêmico de microorganismos orais e de seus produtos (Sonis & Clark 1991; McCarthy *et al.* 1998; Knox *et al.* 2000).

Como conseqüência, tal influxo, freqüentemente, resulta em septicemia em um indivíduo imunocomprometido. De fato, pacientes com mucosite e neutropenia têm um risco relativo desta complicação, o qual é quatro vezes maior do que em indivíduos sem mucosite (Eting *et al.* 1992).

A freqüência da mucosite oral é variável e influenciada pelo diagnóstico, pela idade e pelo grau de saúde oral do paciente, além do tipo, dose e esquema posológico do agente antineoplásico utilizado (Sonis 1998). Aproximadamente 30 a 40% dos pacientes que recebem quimioterapia do câncer apresentam algum grau de mucosite. Ainda, em torno da metade destes indivíduos desenvolve lesões graves que requerem modificação do

tratamento, que inclui analgesia parenteral com narcóticos, interrupção da terapia ou hospitalização para controle da dor, da desidratação ou da desnutrição (Spijkervet & Sonis, 1998).

A incidência dessas condições é consistentemente mais elevada entre pacientes submetidos a terapêuticas para transplantes de medula óssea, terapia de infusão contínua para tratamento dos cânceres de mama e cólon, além de tumores de cabeça e pescoço. Entre pacientes sob protocolos de alto risco, a mucosite grave ocorre com freqüência que excede os sessenta por cento (Knox 2000).

Assim, os fatores que afetam a susceptibilidade a mucosites são heterogêneos e pobremente compreendidos. Embora seja difícil prever se determinado paciente irá desenvolver mucosite apenas em decorrência das drogas administradas, vários agentes possuem claramente maior propensão a lesar a mucosa oral, como o fluorouracil, o metotrexato, a doxorubicina e a aldesleucina (Schubert *et al.* 2000). Entretanto, estimativas precisas são bastante raras de serem obtidas devido à falta de padronização dos procedimentos relatados e às variações de classificação das lesões, somadas à ausência de rotinas estabelecidas de triagem de pacientes recebendo determinados agentes antineoplásicos (McCarthy *et al.* 1998). Finalmente, quando um paciente desenvolve mucosite com determinado esquema quimioterápico, é provável que ocorra mucosite com cursos subseqüentes de terapia se o mesmo esquema ainda for utilizado (Schubert *et al.* 2000).

As lesões ulcerativas surgem como conseqüência dos efeitos citotóxicos inespecíficos dos agentes quimioterapêuticos sobre as mitoses de células de rápida divisão celular, presentes nas camadas basais do epitélio oral (Sonis *et al.* 1990). Tem sido descrita uma hipótese complexa para o mecanismo pelo qual se desenvolve a mucosite oral, a qual é apoiada em três observações: a) a cinética do desenvolvimento de mucosite oral

corresponde ao mesmo período de proliferação celular do epitélio oral. As úlceras surgem aproximadamente uma semana após a administração dos fármacos e cicatrizam por volta dos 14 dias (Laine *et al.* 1992); b) fatores que alteram a taxa basal de proliferação celular também modificam a susceptibilidade dos tecidos aos efeitos das drogas antineoplásicas (Sonis *et al.* 1978; Sonis & Sonis 1979); c) os epitélios que apresentam baixa taxa de proliferação celular, tais como os da pele, são poupados dos efeitos tóxicos dessas drogas (Sonis *et al.* 1994).

A toxicidade direta da mucosa decorrente da quimioterapia constitui a principal causa de mucosite. No entanto, sua forma observada clinicamente pode ser modificada por diversos fatores, como o traumatismo ou irritações física e química da mucosa, infecções e disfunção das glândulas salivares, bem como condições imunes específicas, como pênfigo ou imunodeficiência de IgA . Tal citotoxicidade compromete a mucosa oral e impede o reparo de lesões causadas, inclusive, por funções fisiológicas (Berger & Kilroy 2001). Nesse sentido, a êmese pode induzir o aparecimento de lesões devido à exposição da mucosa ao suco gástrico ácido. Adicionalmente, restaurações dentárias defeituosas, dentes fraturados ou próteses dentárias mal adaptadas podem, também, contribuir para a exacerbação de tais lesões (Sonis *et al.* 1990). Tem sido demonstrado que existe uma forte correlação entre higiene oral deficiente e estomatite. Pacientes que tiveram seus problemas dentários e periodontais resolvidos e que praticaram ótima higiene oral apresentaram uma redução significativa de complicações orais associadas à quimioterapia do câncer (McCarthy *et al.* 1998).

As superfícies mucosas da cavidade oral possuem diferentes taxas de renovação celular, que varia de quatro a cinco dias para a mucosa bucal e labial não queratinizada, e até 14 dias para o palato duro ortoqueratinizado. Quanto mais rápida a taxa de divisão celular das células epiteliais progenitoras, maior a susceptibilidade à lesão por quimioterapia. Do ponto de vista histológico, a lesão da mucosa caracteriza-se pela atrofia da

mesma, presença de infiltrado de células inflamatórias, degradação de colágeno e edema. Clinicamente, estas alterações são inicialmente evidentes na forma de rubor da mucosa. Se o estímulo adverso persistir, poderá ocorrer ulceração na forma de lesões isoladas, podendo evoluir para úlceras confluentes (Peterson & D'Ambrosio 1994).

Em geral, as alterações iniciais da mucosite oral tornam-se evidentes dentro de três a seis dias após o início da quimioterapia. A lesão atinge seu auge dentro de sete a onze dias após a última dose, e, a seguir, observa-se a cicatrização da mucosa nas próximas uma a três semanas (Schubert *et al.* 2000).

Sonis e colaboradores, através de um grande número de observações clínicas e experimentais, têm demonstrado a complexidade fisiopatológica da mucosite. Esses autores propuseram uma hipótese para o desenvolvimento da estomatotoxicidade, descrevendo a mucosite como um processo complexo no qual ocorre uma seqüência de eventos biológicos (Sonis 1998).

Essencialmente, quatro fases interdependentes são descritas. A fase inicial dita vascular ou inflamatória, surge logo após o insulto produzido pelo agente quimioterápico. Nesta, ocorre a liberação de citocinas inflamatórias, resultando em dano tecidual local e aumento da vascularização.

Na segunda fase ou estágio epitelial, o agente quimioterapêutico afeta a fase S do ciclo celular, resultando em taxas reduzidas de divisão celular no epitélio basal oral. Isto conduz a uma menor renovação celular, atrofia e conseqüente ulceração. Esta, possivelmente, deve ser a fase taxa-limitante no processo. De forma interessante, a freqüência da mucosite é muito maior em crianças e isto se deve à alta taxa basal de proliferação celular, do que em adultos, os quais, no entanto, são mais vulneráveis aos fármacos antineoplásicos.

Na terceira fase, áreas localizadas de ulcerações podem ocorrer, as quais tornam-se recobertas por pseudomembranas de fibrina. Em adição, uma colonização secundária por flora microbiana mista, em particular, bactérias Gram-negativas, fornece uma fonte de lipopolissarídeos. Tais endotoxinas podem, adicionalmente, estimular a liberação de citocinas a partir dos tecidos circundantes, exacerbando esta condição. Esta fase ulcerativa e/ou bacteriológica é a mais sintomática e usualmente ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente. Na quarta fase, a cicatrização ocorre concomitantemente com a proliferação e a diferenciação celulares. Além disso, observam-se o retorno da flora microbiana normal e a recuperação do número de leucócitos.

Adicionalmente, estudos recentes têm mostrado que muitos agentes antineoplásicos danificam as células por meio de um programa comum de morte celular chamado apoptose (Plevová 1999). Esta forma de morte é um processo fisiológico que ocorre em células senis ou danificadas e que serve para eliminar aquelas que não estão em uso. Entretanto, uma disfunção em uma via apoptótica pode resultar tanto em excesso, como em deficiência de apoptose. Isto pode resultar em estabelecimento de diferentes estados de doença, como no câncer ou na AIDS (Grodzicky & Elkon 2002). Portanto, é perfeitamente aceitável que a apoptose possa estar envolvida no desenvolvimento da mucosite oral induzida por antineoplásicos (Plevová 1999).

No passado, as complicações orais da terapia antineoplásica eram consideradas inevitáveis e, muitas vezes, não eram reconhecidas precocemente. Além disso, eram tratadas retrospectivamente ao invés de uma maneira preventiva. Felizmente, uma conduta mais cientificamente baseada para análise de tais complicações tem produzido importantes informações relativas à determinação prospectiva de riscos, a intervenções técnicas, aos diagnósticos diferenciais de mudanças dos tecidos duros e moles e às terapias apropriadas (Sonis 2000).

Os sintomas iniciais consistem em irritação e queimação leves. Com a evolução da atrofia e a degradação da mucosa, as queixas de dor oral crescente quase sempre exigem o uso de analgésicos opióides em altas doses (Schubert *et al.* 2000). Durante muito tempo, a maioria dos regimes terapêuticos da mucosite tinha sido orientada essencialmente para a palição dos sintomas e redução da influência dos fatores secundários sobre a mucosite. Mais recentemente, as novas intervenções estudadas têm-se voltado para a prevenção (Knox *et al.*, 2000). Entretanto, um protocolo padronizado relacionando tratamento e medidas preventivas ainda se faz necessário, visto que muitos regimes terapêuticos não possuem sua eficácia claramente estabelecida (Herrstedt 2000; Berger & Kilroy 2001).

Nesse sentido, as abordagens terapêuticas da mucosite podem ser divididas em estratégias preventivas ou curativas. As primeiras incluem três categorias: a) modificação da exposição da mucosa oral aos agentes antineoplásicos, através do uso do alopurinol, crioterapia, brometo de propantelina ou diversificações de esquemas posológicos; b) modificação da proliferação epitelial da mucosa, com o uso de betacaroteno, diniprostona, misoprostol, tretionina, glutamina, citocinas e mitógenos e c) alteração do potencial para complicações infecciosas e inflamatórias da mucosa oral, através do uso de clorexidina, aciclovir, camomila, sucralfato, dentre outros (Knox *et al.*, 2000).

As intervenções curativas da mucosite estabelecida têm sido primariamente direcionadas a suportes analgésicos e nutricionais parenterais. Obviamente, existe um lapso entre os objetivos almejados, prevenção e tratamento. Contudo, observam-se que algumas medidas preventivas são capazes, também, de promover a cura das lesões. Como exemplo, estratégias que modificam a capacidade de proliferação epitelial podem reduzir a incidência, a gravidade e a duração das lesões. Dessa forma, o desenvolvimento de novas abordagens em ambas as direções

deverá surgir a partir de uma melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos moleculares e celulares da mucosite oral (Knox *et al.* 2000)

2.2. Mucosite Intestinal

As mucosas do trato gastrointestinal inferior, dada a sua alta taxa proliferativa, são, também, particularmente susceptíveis a complicações, freqüentemente encontradas em indivíduos submetidos a terapias do câncer, cujos tumores podem ou não ser originários do trato alimentar. Assim, diagnóstico e tratamento apropriados destas condições são a parte crítica de um cuidado multidisciplinar destes pacientes (Sinicropo & Levin 2000).

A exemplo do que ocorre às manifestações orais, as mucosites gastrointestinais também constituem um aspecto especialmente relevante de toxicidade dos agentes antineoplásicos, causando significantes morbidade e mortalidade (Woo *et al.* 2000).

Os estudos sobre mucosite têm sido o interesse dos cientistas há mais de vinte anos (Herrstedt 2000). No entanto, a maioria das pesquisas nesta área tem-se voltado às manifestações orais, sobretudo, devido à maior facilidade de acesso visual e aos resultados dos tratamentos serem bastante evidentes. Isto justifica a pouca compreensão de mecanismos moleculares e celulares das mucosites intestinais. Apesar de sua alta incidência entre os pacientes, seu mecanismo exato não está completamente elucidado, nem tampouco há um protocolo definitivo para prevenção e (ou) tratamento dessas lesões induzidas pela quimioterapia do câncer (Keefe *et al.* 1997).

Mucosite é um termo que descreve uma síndrome caracterizada por ulcerações e sintomas gastrointestinais. A forma intestinal é um efeito colateral comum experimentado por pacientes sob quimioterapia ou radioterapia abdominal para tratamento de cânceres. Contudo, não é um processo mediado exclusivamente ao nível intestinal, observando-se,

concomitantemente, lesões orais, como anteriormente abordadas, mal-estar geral, vômito, anorexia, além de dor abdominal e, principalmente, diarreia. Em muitos casos, esses sinais e sintomas conduzem à redução ou mesmo à suspensão do tratamento quimioterápico. Infelizmente, quando isto ocorre, normalmente o prognóstico do câncer torna-se bastante desfavorável (Sinicrope & Levin 2000).

O epitélio intestinal é composto por uma camada simples de células epiteliais que separam toxinas e antígenos bacterianos, altamente concentrados no lúmen intestinal, dos tecidos linfóides associados ao trato intestinal (Kagnoff & Eckmann 1997). Dessa maneira, tal superfície representa uma importante barreira entre os agentes deletérios presentes no lúmen e o organismo (Sturm *et al.* 1999).

Uma função de barreira mucosa defeituosa, causada por defeitos intrínsecos ou como consequência secundária de inflamação, pode conduzir a uma recaptação antigênica indiscriminada pelo lúmen, o que deprime os mecanismos de defesa do hospedeiro via respostas imunes de mucosa (Gardiner *et al.* 1995). Portanto, um reparo epitelial eficiente é o componente essencial na resolução da inflamação intestinal (Han *et al.* 2000).

De fato, tem-se observado a enorme capacidade da superfície epitelial do intestino de recuperar rapidamente sua integridade após sofrer extensa injúria (Sturm *et al.* 1999). Assim, para o epitélio intestinal poder cicatrizar e restabelecer sua continuidade anterior, ocorre um processo bifásico. Inicialmente, com o objetivo de restaurar a função de barreira da mucosa, observa-se uma migração rápida das células epiteliais viáveis adjacentes ou imediatamente abaixo da superfície injuriada para a área danificada. Este processo ocorre dentro de poucos minutos após injúria física ou química (Wilson & Gibson 1997; Beck & Podolsky 1999) e denomina-se restituição epitelial ou, simplesmente, reepitelização (Lacy 1988).

O principal papel que a restituição epitelial exerce na recuperação da função de barreira é permitir o restabelecimento das zonas de oclusão entre as células. Tais junções regulam a permeabilidade paracelular de macromoléculas, sendo as principais vias de fluxo passivo de solutos (Wilson & Gibson 1997). Tem sido observado que a recuperação de tais solutos na urina pode ser utilizada como forma de detecção não invasiva de alteração de permeabilidade intestinal (Bijlsma *et al.* 1995). Portanto, uma taxa aumentada de excreção de lactulose, a qual utiliza preferencialmente uma rota paracelular para sua absorção, ou de manitol, este por via transcelular, é, usualmente, indicativa de mudanças na função de barreira e (ou) na morfologia do intestino delgado, respectivamente (Figura 5).

Mais tardiamente, na fase regenerativa, a reposição das células perdidas ocorre por um processo dependente de mitose. Então, a espessura do epitélio retorna ao normal, ocorrendo regeneração e migração de células das criptas para a superfície, e diferenciação. Este meio é mais lento e, normalmente, não começa antes de doze ou dezesseis horas após a injúria (Wilson & Gibson 1997; Beck & Podolsky 1999).

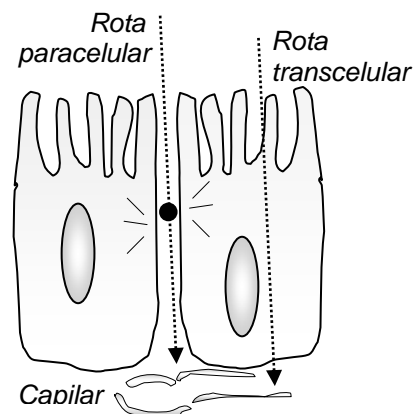


Figura 5: Barreira do epitélio intestinal-rotas de permeabilidade: para serem absorvidos na corrente sangüínea, a lactulose utiliza a rota paracelular, via zonas de oclusão e de extrusão nas pontas dos vilos, e o manitol utiliza a rota transcelular, através dos poros aquosos presentes na membrana celular (Travis & Menzies 1992).

O processo de reepitelização, todavia, é independente de células em divisão, necessitando, sim, de lâmina basal intacta, a qual pode estar livre de

fluxo sanguíneo e não envolver, necessariamente, uma resposta inflamatória. De fato, a reepitelização da mucosa intestinal ocorre antes do aparecimento da resposta inflamatória e, por isso, pode-se prevenir danos mais profundos logo após o estímulo adverso (Banan *et al.* 1998).

Entretanto, nem sempre a restituição epitelial ocorre a contento e, muitas vezes, os mecanismos de respostas inflamatórias são incitados. Vários estudos têm demonstrado a participação de diferentes fatores de crescimento e citocinas como importantes moduladores da reepitelização intestinal e da proliferação celular em modelos *in vitro* e *in vivo* (Paimela *et al.* 1993; Dignass *et al.* 1996; Dignass & Podolsky 1996).

Os fatores de crescimento, uma classe de mediadores solúveis que promovem mitogenicidade (Itoh *et al.* 1993), quimiotaxia (Wahl *et al.* 1987), fibrogênese (Beck & Podolsky 1999) e liberação de citocinas (Raines *et al.* 1989) em um grande número de células, contribuem de forma relevante para o reparo, a remodelagem e a fibrose teciduais.

Dentre as numerosas citocinas que podem modular a restituição epitelial, o fator transformador de crescimento (TGF)- β exerce um papel central, visto que grande número de citocinas que agem promovendo a reepitelização intestinal, o faz por um mecanismo dependente de TGF- β . Entretanto, este fator tem-se mostrado um potente inibidor de proliferação celular, contrabalançando os efeito pró-proliferativos excessivos de um grande número de citocinas e fatores de crescimentos presentes no epitélio intestinal (Sturm *et al.* 1999).

Tem sido demonstrado que os fatores de crescimento de queratinócitos (KGF)-2 também promovem a migração celular, induzindo a reepitelização e subsequente cicatrização de úlceras, semelhantemente ao TGF- β . Tais aspectos podem prevenir influxos de bactérias, de toxinas e de antígenos presentes na luz intestinal (Han *et al.* 2000).

Adicionalmente, o KGF-2 regula positivamente enzimas como as ciclooxigenases tipo dois (COX-2), estimulando, portanto, a produção de prostaglandinas (PG) protetoras. Estas podem inibir o estabelecimento de lesões e induzir a cicatrização da mucosa intestinal. A síntese de prostaglandinas é um mecanismo importante de manutenção de integridade e homeostasia das mucosas do trato gastrointestinal (Tessner *et al.* 1998). Sua produção é regulada pelas formas constitutivas (COX-1) e induzidas (COX-2). Estas, por sua vez, são reguladas positivamente através da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) por citocinas pró-inflamatórias (Jobin *et al.* 1998). De fato, tem sido demonstrado o papel chave das PGE₂ epiteliais na proteção e cicatrização das mucosas afetadas por irradiação (Miceli *et al.* 1999). Somando-se aos efeitos de citoproteção nas mucosas e de proliferação epitelial, as PGE₂ inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias ativadas por macrófagos (Kunkel *et al.* 1986).

Quanto às células da musculatura lisa intestinal humana, em particular, estas exercem um papel importante no reparo do intestino injuriado. O processo de lesão parece ser mediado por citocinas, como a interleucina (IL)-1 β , a qual induz um aumento da expressão de colagenase e inibe a expressão de colágeno nestas células, bem como, promove uma rápida e transiente indução das isoformas COX-1e COX-2 (Longo *et al.* 1998). Em um estudo similar realizado, contudo, em mucosas das vias aéreas, demonstrou-se que a expressão de COX-2 e conseqüente formação de PGE₂ foram inibidas por um antagonista de receptor de IL-1 (Vigano *et al.* 1997). Ambos os estudos sugeriram, dessa forma, que a citocina pró-inflamatória é capaz de induzir a formação de PGE mediada pela expressão *de novo* COX-2. Em suma, a mucosite induzida por agentes antineoplásicos ou por radioterapia surge, portanto, a partir de danos às células epiteliais. Subseqüentemente, ocorrem os processos de reepitelização intestinal e de indução local de diversos mediadores inflamatórios. A resposta inflamatória, então desencadeada, pode ser agravada por variados fatores, como as

infecções secundárias. Isto tornará o paciente predisposto a bacteremias ou septicemia (Woo *et al.* 2000).

Atualmente, existe um grande número de agentes que têm sido estudados para a prevenção e (ou) o manejo das mucosites induzidas pela quimioterapia do câncer, mas nenhum deles mostrou-se suficientemente eficaz, visto que a maioria é direcionada às manifestações orais (Herrstedt 2000). Assim, as abordagens terapêuticas ou preventivas das formas intestinais das mucosites têm incluído os usos de citocinas, prostaglandinas, vitaminas, drogas antiinflamatórias, glutamina e muitas outras medidas que forneçam condições substanciais à reepitelização e à proliferação celular, tão necessárias à homeostasia das mucosas.

3. Mediadores envolvidos nas Mucosites

As mucosites induzidas por agentes antineoplásicos ou radioterapia são causadas por danos das células epiteliais e a subsequente indução local da resposta inflamatória, com ou sem repercussões sistêmicas, visto que a inflamação pode ser agravada por infecções secundárias (Woo *et al.* 2000).

A inflamação é uma resposta dos tecidos a injúrias. Ela envolve uma complexa gama de ativação de enzimas, liberação de mediadores, extravasamento de fluidos, migração de células e destruição e reparo teciduais. Dentre os diversos mediadores inflamatórios liberados, destacam-se as prostaglandinas e as citocinas. Estes desempenham papéis de grande relevância nas mucosites oral e intestinal.

3.1. Prostaglandinas e respostas inflamatórias

A ciclooxigenase (COX) ou prostaglandina H₂ sintetase foi purificada pela primeira vez em 1976 e clonada em 1988. É uma enzima chave na biossíntese das prostaglandinas (PGs). A COX catalisa a adição do oxigênio

molecular ao ácido araquidônico para formar a prostaglandina instável G_2 (PGG_2). Esta, dada a sua instabilidade, é convertida, então, em uma prostaglandina mais estável, a PGH_2 , por uma função de peroxidase. A seguir, a PGH_2 é transformada por uma grande variedade de enzimas e por mecanismos não enzimáticos em prostanóides, PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 (prostaciclina) e TX (tromboxano) A_2 (Vane *et al.* 1998).

A inflamação crônica é um excelente exemplo de que uma doença representa o mau funcionamento dos sistemas de defesa normais do hospedeiro. Assim, antes de se caracterizar a biossíntese das prostaglandinas em fisiológica ou patológica, é melhor fazer uma classificação aplicada às enzimas COX. Desta forma, estão bem caracterizadas duas isoformas principais de ciclooxigenases, a tipo um (COX-1) e a tipo dois (COX-2), as quais diferem em seus modos de regulação e distribuição teciduais (Smith *et al.* 1998). A atividade da COX-1 é constitutiva, presente em quase todos os tipos celulares em um nível constante. A atividade da COX-2 está normalmente ausente nas células e, quando induzida, seus níveis aumentam e diminuem, em questão de horas, após um simples estímulo (Otto & Smith 1995; Herschman 1996).

A descoberta da segunda forma de COX no início da década de 90 foi o mais importante evento em biologia prostanóide em quase 20 anos. Embora existam semelhanças nas atividades enzimáticas entre a COX-1 e a COX-2, seus genes possuem padrões de expressão distintos. A primeira, por ser expressa constitutivamente em células, provavelmente exerce um papel de homeostasia (Smith *et al.* 1998). Exemplificando essa característica, sua ativação conduz à produção de prostaciclina que, uma vez liberada no endotélio é anti-trombogênica, e quando liberada pela mucosa gástrica é citoprotetora (Howe & Dannenberg 2002).

Ao contrário, acredita-se que a COX-2 esteja envolvida em processos inflamatórios e mitóticos. Além disso, esta enzima é regulada positivamente

em resposta a diferentes fatores de crescimentos, promotores de tumor e citocinas (Howe & Dannenberg 2002). Considerando que a COX-2 é induzida por estímulos pró-inflamatórios, como citocinas, sugere-se que os agentes antiinflamatórios exerçam seus efeitos benéficos via inibição dessa enzima, enquanto que seus efeitos indesejáveis, tais como irritação gástrica e toxicidades renais, são devidos à inibição da forma constitutiva COX-1 (Dannhardt *et al.* 2000).

Contudo, tem sido demonstrado que a COX-2 é igualmente expressa constitutivamente nos cordões medulares e espinhais (Beiche *et al.* 1996), no cérebro (Parfenova *et al.* 1997), nos rins (Kömhoff *et al.* 1997), nas ilhotas pancreáticas (Sorli *et al.* 1998) e na mucosa do estômago (Zimmermann *et al.* 1998), além de vasos humanos, onde a COX-2 pode produzir mediadores benéficos e possuir os mesmos efeitos úteis da COX-1.

Assim, a alta seletividade dos inibidores da COX-2 pode, também, causar efeitos colaterais graves, particularmente no sistema cardiovascular (Mitchell & Evans 1998), além de resultar na persistência da inflamação devido a prevenção da síntese de prostanóides antiinflamatórios (Willoughby *et al.* 2000) em diversos sítios de ação, como o trato gastrointestinal e outros locais, onde essa enzima parece possuir um papel importante para o restabelecimento da homeostasia (Schnitzer 2001).

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

Contudo, a COX-3 tem-se mostrado sensível somente a drogas analgésicas e antipiréticas, com baixa atividade antiinflamatória, por

exemplo, o paracetamol e a dipirona. Como a dor e a febre possuem muitas etiologias que envolvem complexas vias celulares e bioquímicas, a descoberta de que a COX-3 seja sensível a tais drogas, sugere, portanto, que o gene da COX-1 possa exercer um papel importante nesses fenômenos. Assim, a inibição da COX-3 pode representar o mecanismo primário e central pelo qual esses fármacos reduzem a dor e, possivelmente, a febre (Chandrasekharan *et al.* 2002).

Embora as prostaglandinas possam estimular certos eventos inflamatórios, seu papel preciso na inflamação está longe de ser estabelecido. Entretanto, tais substâncias peculiares possuem claramente o potencial de atuar como mediadores, moduladores ou ambos. Se desempenharem esses dois papéis, é provável que as prostaglandinas ocupem posição reguladora central no processo inflamatório (Trummel 2000).

Um equilíbrio entre a estimulação e a supressão dos eventos inflamatórios poderia ser alcançado através da regulação local do metabolismo das mesmas, visto que, em alguns sistemas, as prostaglandinas são estimuladoras ou inibidoras, dependendo de sua concentração (Trummel 2000). Desse modo, esses mediadores lipídicos exercem importantes papéis na inflamação, na dor e nas funções fisiológicas normais.

3.2. Citocinas e respostas inflamatórias

Citocinas são pequenos polipeptídeos ou glicoproteínas solúveis de baixo peso molecular que podem ser produzidas, virtualmente, por todos os tipos de células nucleadas do corpo (Vilček & Le 1994). Contudo, são liberadas principalmente por macrófagos e linfócitos. Apresentam papel fundamental na transmissão de mensagens às células, atuando no processo inflamatório e, ainda, apresentam outras funções fisiológicas. Os efeitos

biológicos são dependentes do tipo de citocina e do ambiente celular envolvido, mas, tipicamente, estas moléculas afetam a ativação e a divisão celulares, além da apoptose (Parkin & Cohen 2001).

Assim, esses mediadores possuem efeitos reguladores pleiotrópicos nas células hematopoiéticas e em outros tipos celulares que participam dos processos de defesa e de reparo do hospedeiro. Também podem incluir fatores derivados de linfócitos, conhecidos como linfocinas, fatores derivados de monócitos, chamados monocinas, fatores estimuladores de colônia hematopoiéticos, além de fatores de crescimento de tecido conjuntivo, dentre outros (Vilček & Le 1994).

As citocinas mais relevantes presentes durante as respostas inflamatórias são o fator de necrose tumoral (TNF)- α e a IL-1. Os macrófagos e monócitos são suas fontes celulares primárias, enquanto que o lipopolissacarídeo (LPS) seja, talvez, o mais importante indutor de sua liberação (Di Girolamo *et al.* 1997).

Entre os muitos efeitos fisiopatológicos do TNF- α estão o choque, a citotoxicidade e a caquexia, os quais ocorrem a partir de sua ligação a dois tipos distintos de receptores presentes nos neutrófilos e nas células endoteliais (Wagner & Roth 2000). Dessa maneira, suas ações biológicas dividem-se em endócrinas ou sistêmicas e em parácrinas ou tecido-específicas. Como exemplo de ação endócrina, temos o seu envolvimento na patogênese do choque séptico induzido por LPS de bactérias Gram-negativas. Quanto aos efeitos parácrinos ou tecido-específicos do TNF- α , os mais estudados são aqueles relacionados à sua participação na mediação dos vários eventos que ocorrem nos processos inflamatórios agudos e crônicos. Dentre estes, destacam-se a ativação de neutrófilos, com conseqüente degranulação, produção de intermediários reativos de oxigênio, o aumento da citotoxicidade para certos patógenos e o aumento de atividade fagocítica (Klebanoff *et al.* 1986; Tsujimoto *et al.* 1986); quimiotaxia de neutrófilos e de

monócitos; aumento da adesão de neutrófilos ao endotélio (Beutler & Cerami 1988).

Os neutrófilos podem responder ao TNF- α pela ativação e expressão de integrinas, produção do fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores granulocíticos. Da mesma forma, as células endoteliais mobilizam selectinas, regulam positivamente as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e ativam vias pró-coagulantes em resposta à exposição ao TNF- α . Durante a inflamação e a endotoxemia, os polimorfonucleares liberam, a partir de suas membranas, um receptor solúvel para TNF- α que, uma vez ligado, pode efetivamente inativar o TNF- α circulante (Wagner & Roth 2000).

Adicionalmente, o TNF- α pode promover a estimulação da produção de prostaglandina E₂ e de colagenase por células sinoviais e condrócitos; proliferação de fibroblastos; aumento da reabsorção óssea por osteoclastos e diminuição da síntese óssea por osteoblastos; indução de proteínas de fase aguda no fígado; produção de IL-1 e IL-6 por células endoteliais e por macrófagos; e produção de GM-CSF e G-CSF por células endoteliais (Beutler & Cerami 1988; Larrick & Kunkel 1988; Riches 1995).

A interleucina (IL)-1, conhecida sob várias denominações em mais de quarenta anos, é um importante mediador da inflamação e da febre (Moldawer 1994). Suas fontes celulares e efeitos fisiológicos são semelhantes aos do TNF- α e ambas são, freqüentemente, encontradas juntas em uma grande variedade de cenários inflamatórios. Como o TNF- α , a IL-1 induz a expressão de selectina e ICAM-1 nas células endoteliais e promovem a ativação de integrinas nas células polimorfonucleares. Adicionalmente, o aparecimento precoce de TNF- α e IL-1 no plasma durante um processo inflamatório é um aspecto crítico para a captura e adesão firme dos neutrófilos ao endotélio vascular (Wagner & Roth 2000).

Durante a inflamação, os macrófagos e neutrófilos expressam em suas membranas um receptor antagonista (IL-1ra) que se liga a IL-1. Um receptor decodificador semelhante, contudo, não tem sido encontrado nas células endoteliais. Os IL-1ra, provavelmente, servem para regular a magnitude do processo inflamatório (Wagner & Roth 2000).

As citocinas, de um modo geral, exercem um papel importante na manutenção dos mecanismos de homeostasia necessários para o bem-estar do indivíduo. No entanto, quando surge algum desequilíbrio na produção desses peptídeos e/ou em seus receptores ou em elementos de respostas celulares, ocorrem distúrbios no processo homeostático com conseqüências patológicas. É o caso, por exemplo, do TNF- α que possui ações locais benéficas para o hospedeiro (Pugh-Humphreys & Thomson 1994) ou ainda, o TNF- α e a IL-1 podem ser requisitados para iniciar uma via antiinflamatória necessária a resolução apropriada da inflamação (Wagner & Roth 2000). Contudo, o TNF- α quando gerado em níveis elevados em lesões inflamatórias crônicas, tem seus efeitos pró-inflamatórios freqüentemente sistêmicos (Pugh-Humphreys & Thomson 1994).

Existem, entretanto, citocinas com ações inibitórias sobre a produção de outras citocinas. Um exemplo é a ação inibitória da IL-4 ou da IL-6 na produção de TNF ou IL-1 por monócitos. A IL-10 é outro peptídeo cujas funções biológicas principais parecem ser a inibição de citocinas liberadas por linfócitos Th1 ou por monócitos e macrófagos. Muitas das ações antiinflamatórias ou imunossupressoras de TGF- β também parecem resultar de sua habilidade em suprimir a produção de citocinas em células T e em fagócitos mononucleares. Adicionalmente, uma outra citocina, a IL-13 apresenta forte atividade inibitória sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos estimulados por LPS (Vilček & Le 1994).

Assim, as citocinas pró-inflamatórias podem ser responsáveis por muitos sintomas relacionados a processos inflamatórios via suas ações

locais e sistêmicas ou ainda, induzindo a produção de outros mediadores e iniciando uma cascata de efeitos diversos (Kolios *et al.* 1998)

4. Mucosites induzidas por quimioterápicos antineoplásicos

As mucosites orais e, principalmente, as intestinais induzidas por agentes quimioterápicos em humanos são extremamente difíceis de serem estudadas. O grande número de fatores envolvidos em sua fisiopatologia torna o seu estudo complexo e de difícil padronização. Além disso, por problemas éticos, limita-se, na maioria das vezes, a análises retrospectivas das lesões.

Os tratamentos com fluorouracil, metotrexato ou outros agentes antineoplásicos são as causas mais bem documentadas de mucosites oral e intestinal em indivíduos submetidos a quimioterapias do câncer. Observações clínicas e laboratoriais apoiam fortemente a noção de que o curso evolutivo das mucosites representa um evento biológico complexo caracterizado por mudanças seqüenciais no epitélio e no tecido conjuntivo. Tais alterações são modificáveis pelo *status* hematológico do paciente (Spijkervet & Sonis 1998). Apesar da enorme significância clínica das mucosites, existem, relativamente, poucos estudos direcionados a mimetizar os principais efeitos daquelas drogas em modelos animais (Sonis *et al.* 1990).

Considerando tais aspectos, o ideal é um modelo animal, no qual determinados parâmetros fisiopatológicos possam ser estudados prospectivamente. Nesse sentido, o rato é um modelo experimental bastante útil de mucosite intestinal induzida por metotrexato, muito embora, os danos se concentrem sobretudo no intestino delgado (Howarth *et al.* 1996).

O hamster é um excelente modelo para o estudo das manifestações orais causadas especialmente pelo fluorouracil. Tem sido demonstrado que

a administração de metotrexato nesses animais falhou em reproduzir a mucosite intestinal. A seleção de hamsters é baseada na facilidade de observação de suas mucosas jugais e por sua habilidade em tolerarem doses do quimioterápico capazes de induzir mucosite sem mortalidade significativa. Dada a sensibilidade desses animais às pirimidinas fluoradas, tem sido selecionado o fluorouracil para ser usado nesse modelo (Sonis *et al.* 1990).

5. Drogas utilizadas na abordagem farmacológica

A determinação de algum mediador em um dado evento biológico tem sido feita, principalmente, por abordagens imunológicas, através da utilização de anticorpos específicos. Além disso, são utilizados, extensivamente, métodos bioquímicos e moleculares e abordagens farmacológicas, através de drogas inibidoras da síntese e (ou) da atividade de seus mediadores inflamatórios.

Atualmente dispomos de algumas drogas com capacidade relativamente seletiva para inibição de importantes mediadores, como o celecoxib e a indometacina, inibidores da produção de prostaglandinas, e a pentoxifilina e a talidomida, ambos inibidores da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Estes fármacos têm contribuído sobremaneira para a caracterização do perfil desses mediadores químicos envolvidos em diversas alterações fisiopatológicas.

5.1. Celecoxib

Grandes esforços têm sido investidos no desenvolvimento de drogas antiinflamatórias não esteroidais seletivas para a ciclooxigenase tipo dois (COX-2). Além disso, têm sido requeridas as mesmas potências antiinflamatória e analgésica dos antiinflamatórios convencionais, porém,

com maior margem de segurança, especialmente, ao nível do trato gastrointestinal.

O celecoxib é uma nova droga antiinflamatória não esteroideal que age como inibidor relativamente seletivo da COX-2 (Clemett & Goa 2000). Essa enzima é induzida em resposta a estímulos nocivos, o que conduz à síntese e ao acúmulo de prostanóides inflamatórios, em particular, as prostaglandinas E₂ (PGE₂). Isto, conseqüentemente, causa inflamação, edema e dor (Vane *et al.* 1998).

O celecoxib é extensivamente metabolizado em humanos através de uma via simples oxidativa (Paulson *et al* 2000a), o mesmo sendo observado em ratos (Paulson *et al* 2000b). Entretanto, a distribuição e a excreção dessa droga diferem entre humanos e animais. O celecoxib age como um agente antiinflamatório, analgésico e antipirético por bloquear a produção de prostanóides inflamatórios, via inibição da COX-2, através da formação tempo-dependente de um complexo enzima-inibidor fortemente ligado. Essa ligação não é covalente, mas se dissocia muito lentamente (Clemett & Goa 2000).

Devido aos seus efeitos analgésicos e antiinflamatórios, o celecoxib é usado para o tratamento da inflamação e da dor em pacientes com artrite. Recentemente, em 1998, esse fármaco foi aprovado pelo *Food and Drug Administration-FDA*, órgão americano que regulamenta o uso de fármacos, e liberado para alívio dos sinais e sintomas da osteoartrite e artrite reumatóide em adultos (Paulson *et al.* 2000b).

Considerando a atual definição de estado de especificidade dos novos inibidores de COX-2, trata-se de um medicamento de inibição seletiva, ao contrário da maioria dos demais antiinflamatórios. Não apresenta ação ou apenas uma atividade mínima sobre a enzima ciclooxigenase tipo um (COX-1). Estudos *in vivo* e *ex vivo* mostram que o celecoxib tem afinidade muito

baixa pela COX-1, expressa constitutivamente (Clemett & Goa 2000). Conseqüentemente, em doses terapêuticas, o celecoxib não possui efeito sobre os prostanóides sintetizados pela ativação da COX-1. Portanto, não interfere nos processos fisiológicos normais teciduais relacionados a esta enzima, particularmente no estômago, intestinos, plaquetas e rins (Masferrer *et al.* 1994; Smith *et al.* 1998).

Os inibidores de COX-2 apresentam atividades antiinflamatórias como seus principais efeitos, e dados de estudos clínicos recentes demonstram estarem associados especialmente ao alívio da dor e sintomas da osteoartrite (Gilroy *et al.* 1998). Entretanto, tem sido mostrado que a COX-2 é expressa constitutivamente em diversos sítios, podendo produzir mediadores benéficos e possuindo os mesmos efeitos úteis como os da COX-1, isto é, a alta seletividade dos inibidores da COX-2 pode causar efeitos colaterais graves, particularmente no sistema cardiovascular (Mitchell & Evans 1998).

Em estudos clássicos de inflamação, o celecoxib reduziu o processo inflamatório nas doses de 10 e 50 mg/kg em modelo de edema de pata de ratos induzido por zimosan. Contudo, nas doses de 100 e 200 mg/kg, o celecoxib não apresentou tais efeitos, demonstrando, de fato, que o celecoxib perde sua eficácia antiinflamatória em doses mais elevadas (Niederberger *et al.* 2001).

Corroborando esses achados, tem sido descrito que o celecoxib, tanto em concentrações baixas como 1 e 10 μM , como em concentração mais alta de 50 μM , foi capaz de inibir significativamente a liberação de PGE_2 induzida por interleucina (IL)- 1β . Entretanto, nesta concentração mais elevada, o celecoxib induziu um aumento significativo da expressão de COX-2 (Niederberger *et al.* 2001).

Desse modo, o celecoxib tem sido considerado uma importante ferramenta para o tratamento de condições inflamatórias diversas, onde a inibição da isoenzima COX-2 seja de fundamental relevância para o processo terapêutico.

5.2. Indometacina

A indometacina foi o primeiro resultado de uma pesquisa laboratorial para desenvolver medicamentos com propriedades antiinflamatórias. Ela foi introduzida em 1963 para tratar a artrite reumatóide e doenças semelhantes. Embora a indometacina ainda esteja sendo usada e seja bastante eficaz, seus efeitos tóxicos limitam muito sua utilização (Robert II *et al.* 2003).

A indometacina é um derivado do ácido indolacético, atuando como um dos mais potentes inibidores da enzima COX. Além desta ação, ela inibe a motilidade dos leucócitos polimorfonucleares e a proliferação de células endoteliais, um aspecto relevante para a sua ação antiangiogênica (Pai *et al.* 2000). Como os salicilatos, possui efeitos sobre numerosos eventos bioquímicos e celulares, os quais podem ou não estar envolvidos no processo inflamatório. Portanto, em alguns desses eventos, é possível a presença de prostaglandinas (Carvalho 2002).

A indometacina produz efeitos antipiréticos e analgésicos, sendo os últimos, mais notáveis quando a dor decorre de alguma condição inflamatória. Todavia, em virtude de sua grave toxicidade, este fármaco não deve ser utilizado como antipirético ou analgésico simples. Uma exceção é representada pelo seu uso como antitérmico na doença de Hodgkin, não responsiva a outros agentes. Desse modo, esse fármaco é reservado para os casos de artrite reumatóide, espondilite anquilosante e osteoartrite, nos quais as drogas menos tóxicas são ineficazes ou não são toleradas (Trummel 2000).

Adicionalmente, foi utilizada como tratamento a curto prazo na bursite, tendinite e ataques agudos de artrite gotosa. Em certas ocasiões, esse agente foi administrado como tocolítico e para promover o fechamento de um canal arterial persistente. Em ambos os casos, o mecanismo consiste na inibição da produção de prostaglandinas (Carvalho 2002).

A indometacina é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo obtidas concentrações plasmáticas em uma a duas horas. A droga se liga, em grande parte, às proteínas plasmáticas. Após uma única dose, a maior parte do fármaco é eliminada na urina sob a forma de vários metabólitos durante as 24 horas seguintes. Sua meia-vida plasmática é variável, cerca de três horas (Robert II *et al.* 2003).

O tratamento com indometacina provoca efeitos adversos comuns. Com freqüência, ocorrem distúrbios gastrointestinais, como dor epigátrica, náusea e diarreia. A droga também pode causar perfuração do esôfago, estômago e duodeno, e a hemorragia resultante pode ser fatal. Por conseguinte, esse agente é contra-indicado a pacientes com lesões gastrointestinais ativas ou história dessas lesões (Trummel 2000).

Tem sido descrito que a indometacina é capaz de abolir completamente a produção de fatores de crescimento de hepatócitos (HGF) e de PGE₂ induzida por IL-1 β em lesões gástricas. Dessa forma, sugere-se que a via IL-1 β – PG – HGF possa exercer um importante papel no processo de reparo dessas mucosas. Assim, drogas como a indometacina podem retardar a cicatrização de úlceras, ao menos em parte, pela supressão de HGF via inibição da produção endógena de prostaglandinas (Bamba *et al.* 1998).

Vários outros estudos têm determinado as ações da indometacina nas ulcerações de mucosas gástricas, extravasamento de plasma e leucócitos, além de conduzir a uma diminuição do fluxo sanguíneo ao nível das

vilosidades de intestino de ratos. Adicionalmente, a indometacina tem sido responsável por diferentes padrões de perfusão na mucosa intestinal (Ruth *et al.* 1999).

A indometacina é um agente antiflogístico não esteroidal amplamente utilizado para tratamento de diversas doenças. Embora seus efeitos colaterais sejam graves, esta droga é bastante utilizada como importante ferramenta farmacológica em diversos modelos animais de inflamação.

5.3. Pentoxifilina

A pentoxifilina ou oxipentifilina é uma metilxantina que foi descrita inicialmente como agente hemorreológico, favorecendo a perfusão da microcirculação sangüínea de leitos periféricos e cerebrais, portanto, útil para a terapia de diversas doenças vasculares. O mecanismo pelo qual ela aumenta o fluxo sangüíneo parece ser relacionado a uma melhora geral em seus efeitos farmacodinâmicos primários, que consistem no aumento da deformidade das células vermelhas e na redução da viscosidade sangüínea, da agregação plaquetária e das concentrações plasmáticas de fibrinogênio (Ward & Clissold 1987).

Contudo, tem-se tornado evidente que a pentoxifilina possui importantes efeitos adicionais, como a capacidade de modular a resposta imune à luz de sua habilidade de inibir citocinas como a IL-2, a IL-6, a IL-12 e o INF- γ (Thanhauser *et al.* 1993; Moller *et al.* 1997b). Além disso, tem sido demonstrado, em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, que os efeitos antiinflamatórios dessa droga podem ser mediados através da indução de moléculas antiinflamatórias endógenas (Platzer *et al.* 1995; Jilg *et al.* 1996; Fujimoto *et al.* 1999). Foi observado que a produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória, foi inibida por 10^{-3} M de pentoxifilina, mas teve sua produção aumentada por 10^{-4} M de PTX. Isto sugere, no entanto, que a diferente

regulação de IL-10 é dependente da concentração da droga (D'Hellencourt *et al.* 1996).

Esse fármaco pode inibir a adesão e a ativação de linfócitos humanos (González-Amaro *et al.* 1998) e tem sido verificado que é capaz de inibir fortemente a agregação plaquetária espontânea e induzida *in vitro* e *in vivo* através da inibição da fosfodiesterase. Tal inibição resulta em elevação dos níveis de AMP_c (Schandené *et al.* 1992; Yang *et al.* 1995), redução da síntese de tromboxano e aumento da produção de prostaglandinas (Ward & Clissold 1987).

Embora o mecanismo de ação da pentoxifilina não esteja claramente elucidado, tem sido descrito que esta droga inibe, de forma relevante, a produção de citocinas, principalmente a síntese de TNF- α (Doherty *et al.* 1991; Neuner *et al.*, 1994). O seu uso bem sucedido, por exemplo, no tratamento do eritema nodoso da lepra, parece estar relacionado à atividade inibitória desta citocina (Sampaio *et al.* 1998).

O TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e monócitos ativados, exerce um papel chave como mediador das respostas inflamatórias e imunes. Sua produção por fagócitos mononucleares é regulada por níveis intracelulares de AMP_c. De fato, análogos de AMP_c e outras substâncias como as prostaglandinas E₂, capazes de aumentar os níveis de AMP_c, reduzem a liberação de TNF- α através de uma regulação negativa da expressão de seu gene (Doherty *et al.* 1991; Schmidt-Choudhury *et al.* 1996). Estudos recentes relataram a habilidade da teofilina em suprimir a produção de TNF- α por macrófagos e monócitos por aumentar o acúmulo intracelular de AMP_c (Marques *et al.* 1999).

A pentoxifilina, um derivado da metilxantina, relacionada a aminofilina e a cafeína, exerce seus efeitos farmacológicos por inibir a fosfodiesterase,

aumentando assim, as concentrações intracelulares de AMPc. Nesse sentido, a pentoxifilina pode inibir a produção de TNF- α através desta via de AMPc (Doherty *et al.* 1991) .

Embora a produção de citocinas inflamatórias possa ser benéfica ao hospedeiro, por promover o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e ativar suas funções microbidas em tecidos inflamados ou infeccionados, sua ativação prolongada, disseminada ou excessiva dos PMN pode iniciar uma injúria microvascular, resultando em permeabilidade vascular aumentada, hemorragia e trombose. Assim, a produção de citocinas, de forma intensa, generalizada ou crônica, pode conduzir a danos teciduais (Movat *et al.* 1987).

Muitos distúrbios estão freqüentemente associados com uma elevação sérica dos níveis de TNF- α , e muitos procedimentos terapêuticos, como quimioterapia, irradiação e transplante de medula óssea, podem induzir a expressão de TNF- α (Yang *et al.* 1995).

Portanto, a pentoxifilina tem sido usada há vários anos para o tratamento de doenças vasculares. É normalmente bem tolerada mesmo em doses altas, sem efeitos colaterais sérios. Assim, este fármaco é um agente imunomodulador que tem sido considerado uma importante ferramenta terapêutica para o tratamento de condições imunoinflamatórias nas quais as células T estejam envolvidas (González-Amaro *et al.* 1998).

5.4. Talidomida

A talidomida, uma α -N-fitalimidoglutaramida, foi sintetizada em 1954 pelo químico Kunz, como uma droga sedativa (Kunz 1956). Foi considerada particularmente segura, alcançando a posição de hipnosedativo em 1957, e em 1960 já havia sido comercializada em mais de 20 países (Eriksson *et al.* 2001).

Em 1961, contudo, McBride e Lenz, dois médicos trabalhando independentemente um do outro, suspeitaram da ligação entre o nascimento de crianças com malformações e a utilização de talidomida no primeiro trimestre de gravidez (McBride 1961; Lenz 1988). Esta droga foi retirada do mercado, mas seu uso resultou em mais de 10.000 vítimas, com anormalidades como focomelia, que consiste de encurtamento de membros ou amelia, ausência de membros, além de alterações em orelhas, olhos, coração e sistema gastrointestinal (Eriksson *et al.* 2001).

Vários outros efeitos colaterais limitam o uso da talidomida. O aparecimento de neuropatia periférica, descrita muitas vezes por sintomas sensoriais, com parestesia simétrica dolorosa das mãos e dos pés, tem sido relatado. Frequentemente, observa-se suave fraqueza muscular ou evidente dano ao trato piramidal e síndrome do túnel carpal (De long 1990). Sonolência, tontura, alterações de humor, constipação e xerostomia são, também, citados por pacientes que tomam talidomida (Tseng *et al.* 1996).

Surpreendentemente, mesmo após o impacto do desastre da talidomida, esta droga continuou a ser usada na terapia de diversas doenças por pesquisadores. Em 1965, Sheskin relatou que os pacientes com lepra, os quais receberam talidomida como sedativo, experimentaram um alívio espetacular dos sintomas (Sheskin 1965). A aplicação deste fármaco para tratamento da lepra continuou e, em 1998, foi aprovada formalmente para

este propósito pelo Food and Drug Administration-FDA, órgão americano que regulamenta o uso de fármacos, sob rígido controle.

Os relatos de Sheskin conduziram-nos a um novo interesse pela talidomida e, desde então, apesar de ter sua comercialização proibida, ela vem sendo seletivamente reintroduzida na prática clínica, como a droga de escolha para o tratamento de várias desordens sistêmicas. Assim, doenças para as quais a talidomida tem apresentado valor potencial terapêutico, incluem artrite reumatóide, fotodermatite, síndrome de Behçet, lúpus eritematoso discóide, doença enxerto-versus-hospedeiro, malária, tuberculose, síndrome da imunodeficiência adquirida, cânceres de cólon e de mama, mieloma múltiplo refratário, tumor de próstata, síndromes mielodisplásicas, doença de Crohn, diabetes, glioblastoma e muitas outras (Hashimoto 2002).

Embora as aplicações farmacológicas da talidomida sejam amplamente investigadas, a base molecular de suas ações não tem sido esclarecida (Calabrese & Fleischer 2000). Seus efeitos farmacológicos, contudo, relacionam atividades anticaquexia, antipromotora de tumor, antiangiogênica, antimetastática, antiviral e efeito hipoglicemiante (Hashimoto 2002).

Assim, diversas ações antiinflamatórias e imunomodulatórias têm sido demonstradas em estudos *in vivo* e *in vitro* (Tseng *et al.* 1996). As primeiras descrições documentadas do efeito inibitório da talidomida sobre a produção de TNF- α através do aumento da degradação de seu RNAm (Moreira *et al.* 1993), sem afetar a produção de outras citocinas, tais como IL-1, IL-6 ou GM-CSF (Sampaio *et al.* 1991), levaram-nos a uma melhor compreensão de seus efeitos. Desde esse tempo, a talidomida tem sido vista como um agente imunomodulador capaz de inibir a inflamação e as respostas tipo-Th1 *in vitro* (McHugh *et al.* 1995; Moller *et al.* 1997b). Níveis séricos elevados de TNF- α foram reduzidos e sintomas clínicos, incluindo caquexia, foram melhorados

após tratamento com talidomida em pacientes com tuberculose e HIV (Klausner *et al.* 1996) ou eritema nodoso da lepra (Sampaio *et al.* 1993). Além disso, uma inibição específica da produção de IFN- γ e um aumento da produção de IL-4 e IL-5, também têm sido observados em cultura de células mononucleares de sangue periférico humano (McHugh *et al.* 1995).

Apesar de doses de talidomida, capazes de promover cicatrização de úlceras aftosas em pacientes infectados por HIV, terem causado um inesperado aumento plasmático nos níveis de TNF- α e na produção de HIV (Jacobson *et al.* 1997), outros estudos demonstraram que, em pacientes doentes por HIV, com sintomatologia mínima, a talidomida induziu ganho de peso. Os níveis plasmáticos de TNF- α não foram marcadamente elevados aos níveis basais, e houve uma suave, porém significativa, melhora na resposta à talidomida (Haslett *et al.* 1997b).

A talidomida, em modelo de microbolsas de córneas de coelhos, mostrou-se ser um potente inibidor de angiogênese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos. Entretanto, sua ação parece ser dependente da espécie estudada, visto que falhou em demonstrar tal atividade em roedores (Keifer *et al.* 2001). Em adição, tem sido recentemente demonstrado que ela afeta a mobilidade e a proliferação de queratinócitos, pontuando o possível envolvimento da talidomida na regeneração tecidual, pelo menos nas desordens dérmicas (Nasca *et al.* 1999).

Nesse contexto, o interesse na utilização da talidomida é crescente devido ao seu potencial antiinflamatório e imunomodulador, especialmente como inibidor da produção de TNF- α . Dessa forma, sua atuação sobre uma vasta classe de reações inflamatórias, tem demonstrado que o seu uso pode ser bem mais extenso (Lima 1999), óbvio que resguardando seus principais efeitos colaterais, teratogenia e neurite.

6. Justificativas e objetivos

O manejo de diversas toxicidades relacionadas à quimioterapia, como a mielossupressão, náuseas e vômitos, tem evoluído. No entanto, a incidência de mucosites tem aumentado. Este efeito colateral é um processo inflamatório que acomete as mucosas orais e intestinais, e pode ser considerado uma importante toxicidade limitante do uso de agentes citotóxicos antimetabólitos, tais como 5-fluorouracil e o metotrexato (Loprinzi *et al.* 1995, Berger & Kilroy 2001).

Atualmente, o tratamento consiste apenas em uma abordagem essencialmente paliativa, não existindo um protocolo de atendimento preventivo e eficaz da mucosite. Mesmo havendo uma extensa literatura a esse respeito, falta ainda uma resposta definitiva sobre o papel da inflamação na mucosite. Isso, provavelmente, está relacionado a pouca compreensão dos mecanismos específicos, através dos quais o processo inflamatório pode mediar tais lesões teciduais. Entretanto, alguns grupos de compostos, chamados citocinas, que devido às suas origens celulares e efeitos sobre as células alvo, podem fornecer alguma informação para a compreensão da fisiopatologia da mucosite. Assim, a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF) são mediadores que podem potencialmente participar nesse processo. Tais citocinas estimulam a COX-2, induzindo, dessa maneira, a síntese de prostaglandinas envolvidas em processos inflamatórios e, possivelmente, perpetuando ou, ainda, simplesmente modulando as lesões.

Assim, até o presente momento, não existe descrito na literatura, qualquer estudo definitivo do papel das prostaglandinas ou de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , como possíveis agentes implicados na gênese destas mucosites.

Tais aspectos, somados à disponibilidade de algumas drogas que têm ajudado sobremaneira a caracterização do perfil de importantes mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e citocinas, envolvidos em diversas alterações fisiopatológicas, contribuíram para o delineamento dos objetivos desse trabalho, os quais foram:

1. Validar os modelos de mucosites oral em hamsters e intestinal em ratos e camundongos, induzidos por drogas quimioterápicas, e estudar as respectivas respostas inflamatórias através de:
 - 1.1. Análise dos índices inflamatórios, histopatologia, dosagem de mieloperoxidase, leucograma e variação de massa corpórea, em modelo de mucosite oral em hamsters;
 - 1.2. Análise dos índices inflamatórios, histopatologia, leucograma, variação de massa corpórea, de ingestão de líquidos e alimentos, análises de imunohistoquímica para TNF- α na mucosite intestinal em ratos ou camundongos;
 - 1.3. Análise da permeabilidade de mucosa em modelo de mucosite intestinal em ratos;
2. Avaliar o efeito de inibidores farmacológicos da síntese de prostaglandinas, como o celecoxib ou a indometacina, no curso das mucosites oral e intestinal, induzidas por drogas quimioterápicas em hamsters e ratos, respectivamente;
3. Avaliar o efeito de inibidores farmacológicos da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a pentoxifilina e a talidomida, no curso das mucosites oral e intestinal, induzidas por drogas quimioterápicas em hamsters e ratos, respectivamente.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Os protocolos experimentais foram executados de acordo com as diretrizes aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC para uso de animais experimentais, os quais foram mantidos sob condições de temperatura ambiente e ciclos claro-escuros controlados durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados, a dor, o sofrimento e o estresse dos mesmos.

A. Mucosite Oral Experimental

Foram utilizados hamsters *Golden (Mesocricetus auratus)* machos, com massa corpórea entre 120 e 160 gramas, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC), onde foram alojados em gaiolas apropriadas, em número de dois animais em cada uma delas, com alimentação balanceada à base de sementes e cereais, como aveia, milho, semente de girassol e abóbora (sem sal). A água foi disponibilizada à vontade.

B. Mucosite Intestinal Experimental

Foram utilizados ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* machos, com massa corpórea entre 180 e 240 gramas, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC). Esses animais foram acomodados, individualmente, dois dias antes do início dos experimentos, em gaiolas tipo metabólica. Todos receberam ração balanceada e água em quantidades controladas, e permaneceram nas mesmas condições durante os demais dias experimentais.

Adicionalmente, foram utilizados camundongos C57BL/6 (*Mus domesticus domesticus*) machos, com seus receptores R1 íntegros (TNF-R1 +/+), com massa corpórea entre 25 e 30 gramas, provenientes do Biotério geral do Campus Universitário de Ribeirão Preto-USP e do Biotério setorial de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Esses animais isogênicos foram reproduzidos através de acasalamentos consangüíneos sucessivos entre irmãos e irmãs.

Para determinar a função de TNF- α , foram usados animais geneticamente manipulados, produzindo uma linhagem mutante com uma anormalidade conhecida como *Knockout*, provenientes de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine, USA) e mantidos o Biotério setorial do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina, da mesma universidade. Assim, usou-se o modelo de mucosite intestinal induzida por metotrexato adaptado em camundongos C57BL/6 *Knockout* para o receptor R1 (p55) de TNF- α (TNF-R1 -/-).

2. Drogas, Anticorpos, Soluções, Líquidos e Corantes utilizados

- Fluorouracil: ampola de 10 ml (25 mg/ml) – Fluoro-Uracil[®] (Roche, Rio de Janeiro, Brasil);
- Metotrexato: frasco-ampola de 2ml (25 mg/ml) – Metotrexato [®] (Pharmacia, Rio de Janeiro, Brasil);
- Celecoxib: cápsulas de 100 mg – Celebra[®] (Searle, São Paulo, Brasil);
- Indometacina: pa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
- Pentoxifilina: ampolas de 5 ml (20 mg/ml) – Trental[®] (Hoechst, São Paulo, Brasil);
- Talidomida: comprimido de 100 mg (CEME, Brasil);
- Dimetil sulfóxido – DMSO[®] (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO);
- Anticorpo primário anti-TNF- α anti-rato (Vector[®], USA);
- Anticorpo secundário anti-IgG anti-carneiro (Vector[®], USA);
- Heparina 5.000 UI/ml (Roche, Rio de Janeiro, Brasil);
- Álcool etílico 70% (Reagen);
- Cloral hidratado 10% (Reagen);
- Formaldeído 40% (Reagen);
- Solução aquosa de NaCl a 0,9% (15M), frasco de 500 ml (Tayuyna);
- Líquido de Turk (diluidor para contagem total de células)
 - Ácido acético glacial P. A. (Merck)20,0 ml
 - Violeta de genciana2,0 ml
 - Água destilada.....1000 ml;
- Hematoxilina (Reagen);
- Eosina (Merck);

Fluorouracil (5-FU), Metotrexato (MTX), Celecoxib (CLX) e Pentoxifilina (PTX) foram diluídas em solução salina 0,9%; Talidomida (TLD), em solução a 2% de DMSO em salina estéril acidificada (pH 5,0) e Indometacina (IND), em solução a 5% de bicarbonato de sódio em salina estéril.

3. Protocolos experimentais

3.1. Modelo de mucosite oral induzida em hamsters

Usou-se o modelo de mucosite oral experimental, desenvolvido por Sonis *et al.*, 1990 e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC

Os hamsters receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-fluorouracil nos dias 1 e 2, via intraperitoneal (ip), respectivamente. No 4º dia foram feitas escoriações nas mucosas jugais direitas e esquerdas dos animais, previamente anestesiadas com Hidrato de cloral (300 mg/kg), com o auxílio de uma agulha com ponta romba, como fator potenciador para a mucosite, ou seja, conferindo um trauma mecânico (TM). As ranhuras foram distribuídas em número de quatro no sentido horizontal e cruzadas por mais quatro, em ambas as faces das mucosas (Figura 1).

Realizou-se um estudo piloto onde 42 animais foram mortos em diferentes intervalos de tempo após a indução da mucosite oral (dias 0, 4, 5, 10, 12, 14 e 16 após a 1ª injeção de 5-FU, com o objetivo de se escolher o dia ideal para se proceder às modulações farmacológicas com celecoxib, indometacina, pentoxifilina e talidomida. Assim, em função dos dados obtidos, o 10º foi escolhido, por ser o dia no qual foi observado maior intensidade do processo inflamatório.

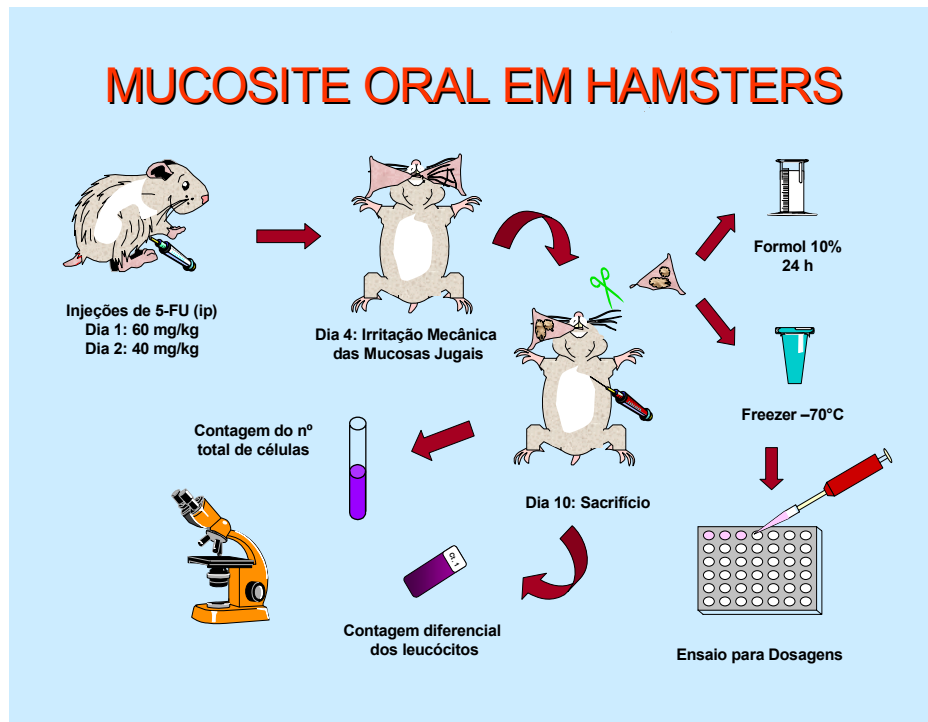


Figura 1: Desenho esquemático do protocolo experimental de mucosite oral: Os hamsters receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-fluorouracil nos dias um e dois. No 4º dia foram feitas escoriações nas mucosas jugais direitas e esquerdas dos animais, com o auxílio de uma agulha com ponta romba, como fator potenciador para a mucosite, distribuídas em número de quatro no sentido horizontal e cruzadas por mais quatro, em ambas as faces das mucosas. No 10º dia, as mucosas jugais foram fotografadas, removidas, divididas em partes iguais para serem congeladas ou fixadas em formol e subsequentes processamentos para coloração pelo método H&E.

3.1.1. Grupos experimentais

Foram utilizados cento e cinquenta hamsters durante todo o decorrer desse estudo, distribuídos em número de quarenta e dois animais no estudo piloto, e cento e oito nos diversos grupos experimentais discriminados a seguir:

A. Grupos controles

Os quatro grupos controles foram constituídos, cada um deles, por seis hamsters submetidos à mucosite oral. Os animais receberam injeções de solução salina a 0,9% (0,5 ml), administradas por via subcutânea (sc), 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, após estas, diariamente por um período de dez dias, sendo então, sacrificados.

B. Grupo tratado com celecoxib

Os animais, submetidos à mucosite oral por fluorouracil, foram subdivididos em 4 grupos de seis hamsters cada, os quais receberam celecoxib (Celebra[®]), nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, respectivamente, administradas por via subcutânea, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, após aquelas, diariamente durante dez dias.

C. Grupo tratado com indometacina

Os animais, submetidos à mucosite oral por fluorouracil, foram subdivididos em 3 grupos de seis hamsters cada, os quais receberam indometacina (Sigma), nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg, respectivamente, administradas por via subcutânea, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, após aquelas, diariamente durante dez dias.

D. Grupo tratado com pentoxifilina

Os animais, submetidos a mucosite oral por fluorouracil, foram subdivididos em 3 grupos de seis hamsters cada, os quais receberam pentoxifilina (Trental[®]), nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, respectivamente, administrados por via subcutânea, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, aquelas, diariamente durante dez dias.

E. Grupo tratado com talidomida

Os animais, submetidos à mucosite oral por fluorouracil, foram subdivididos em 4 grupos de seis hamsters cada, os quais receberam talidomida (CEME), nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, respectivamente, administrados por via subcutânea, 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, aquelas, diariamente durante dez dias.

3.1.2. Parâmetros avaliados

3.1.2.1. Análise da estrutura das mucosas jugais

A. Análise macroscópica das mucosas jugais

No 10º dia, os animais foram mortos e suas mucosas jugais foram fotografadas antes de serem removidas. Para a análise macroscópica foram avaliados os aspectos inflamatórios como presença e intensidade de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados de acordo como os escores padronizados em nosso laboratório (LAFICA-UFC), citados a seguir:

- **Escore 0:** hiperemia e eritema ausentes ou discretos; hemorragia ausente; ausência de úlceras e de abscessos.

- **Escore 1:** hiperemia e eritema moderados; hemorragia ausente; ausência de úlceras; ausência de abscessos; presença de tecido cicatricial.
- **Escore 2:** hiperemia e eritema acentuados; presença de hemorragia, presença de úlceras pequenas, de até 1 cm de diâmetro, presença de maior área cicatricial e ausência de abscessos.
- **Escore 3:** hiperemia e eritema acentuados; presença de hemorragia, de úlceras extensas e abscessos.

B. Análise histopatológica das mucosas jugais

Os estudos histológicos das mucosas jugais foram realizados em cortes seriados de 5 µm de espessura, ao microscópio óptico (x 40 e 100). No 10º dia, os animais foram mortos e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas e divididas, onde uma parte foi fixada em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas, e a outra, congelada. Para análise microscópica foram avaliados os aspectos inflamatórios como presença e intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlcera e abscessos, classificados de acordo com os escores padronizados em nosso laboratório, citados a seguir:

- **Escore 0:** epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- **Escore 1:** ingurgitamento vascular discreto; áreas de reepitelização; infiltrado celular discreto, com maior número de leucócitos mononucleares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.

- **Escore 2:** ingurgitamento vascular moderado; degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos.
- **Escore 3:** ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuada; infiltrado celular acentuado, com maior número de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

C. Dosagem da mieloperoxidase

As medidas de atividade da mieloperoxidase, enzima presente abundantemente em neutrófilos, foram realizadas a partir das mucosas jugais dos hamsters, usando uma versão modificada do método descrito por Bradley *et al.* 1982. No 10º dia, os animais foram mortos e suas mucosas, após serem fotografadas, foram removidas e divididas, onde a parte congelada e mantida em *freezer* a 20°C negativos, foi utilizada para o ensaio. As amostras foram pesadas e trituradas em homogeneizador Politron Ultra-Turrax em solução tampão (NaCl, NaPO₄ e NaEDTA), sob condições adequadas de refrigeração. A seguir, foram centrifugadas a 4°C, durante 15 minutos, com frequência de 3.000 rpm. O *pellet* obtido foi ressuspensionado na mesma solução tampão e novamente centrifugado. O novo *pellet* obtido foi ressuspensionado em uma segunda solução tampão (NaPO₄ e H-TAB), re-homogeneizado, congelado e descongelado e centrifugado a 4°C, durante 15 minutos, com frequência de 10.000 a 20.000 rpm. O sobrenadante foi colhido e devidamente armazenado para posterior ensaio da mieloperoxidase, utilizando placa de 96 poços e leitura da densidade óptica a 450 nm em espectrofotômetro. As enzimas mensuradas foram expressas como quantidade de mieloperoxidase (MPO) por grama de mucosa jugal.

3.1.2.2. Análise das alterações sistêmicas dos animais

A. Análise da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas 1 hora antes de cada injeção de 5-FU ou das escoriações (TM) e, após estas, diariamente durante os dez dias do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g), em relação à massa inicial.

B. Estudo hematológico

No 10º dia, os animais foram anestesiados com Hidrato de cloral a 10% (300 mg/kg; ip). Em seguida, puncionou-se o coração do animal e o sangue colhido foi utilizado para a confecção do esfregaço corado pelo método H&E, para as contagens diferenciais. Adicionalmente, 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Logo após, os animais foram mortos por deslocamento cervical.

C. Estudo das mucosas gástricas

No 10º dia, após as devidas coletas dos dados citados anteriormente, grupos de animais normais ou submetidos a mucosite oral e que receberam solução salina, celecoxib ou indometacina, tiveram seus estômagos retirados, instilados com solução de formalina a 5% durante quinze minutos, abertos ao longo da grande curvatura, lavados com solução salina e inspecionados para as atribuições de escores de acordo com os critérios de Szabo e colaboradores, onde foram consideradas perdas de pregas da mucosa, descoloração, edema, presença de hemorragia, número de petéquias e intensidade de ulcerações (Szabo *et al.* 1985).

3.2. Modelo de mucosite intestinal induzida em ratos

Usou-se o modelo de mucosite intestinal experimental descrito por Vanderhoof *et al.*, 1990, e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC.

Os ratos receberam três doses de 2,5 mg/kg de metotrexato nos dias 1, 2 e 3, via subcutânea (sc), respectivamente. Em um estudo piloto, 24 animais receberam doses de 1,5, 2,5 e 3,5 mg/kg de metotrexato ou apenas 0,5 ml de solução salina, por três dias consecutivos, a fim de se escolher a dose que produz injúrias consistentes nas mucosas intestinais, com o mínimo de letalidade. Foi verificado que a dose de 2,5 mg/kg produz tais injúrias dentro de 40 horas desde a última injeção de metotrexato. Assim, em função dos dados obtidos, foi escolhido o 5º dia, no qual foi observado maior intensidade do processo inflamatório e, portanto, ideal para se proceder às modulações farmacológicas com celecoxib, pentoxifilina e talidomida (Figura 2).

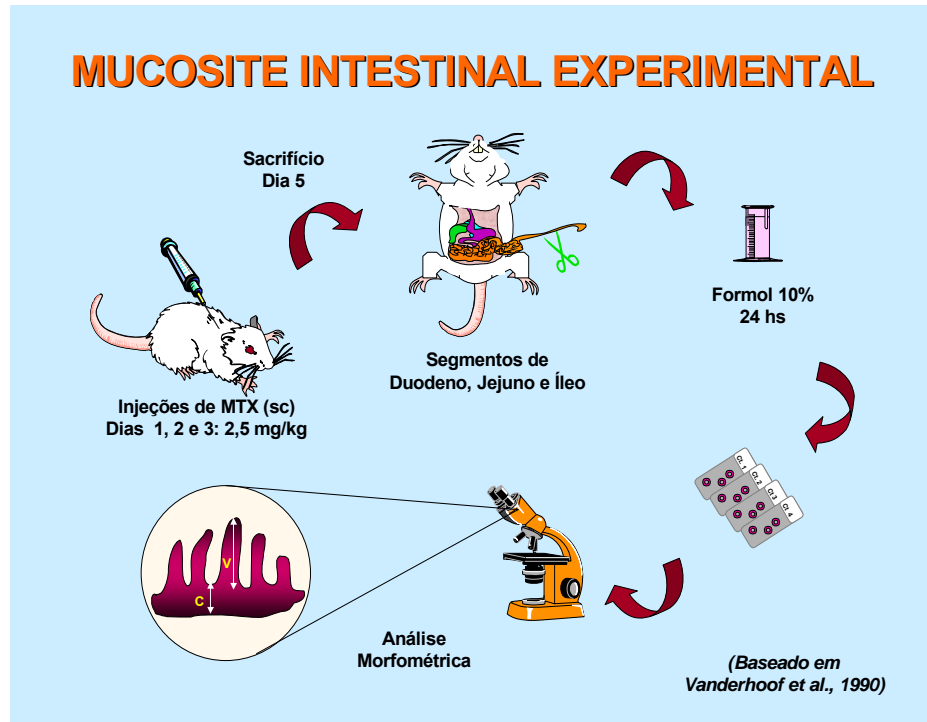


Figura 2: Desenho esquemático do protocolo experimental da mucosite intestinal em ratos ou camundongos: os animais receberam três injeções de 2,5 mg/kg de metotrexato nos dias 1, 2 e 3, respectivamente. No 5º dia, os mesmos foram mortos e tiveram segmentos de duodeno, jejuno e íleo removidos, divididos em partes iguais para serem congelados ou fixados em formol e subsequentes processamentos para coloração pelo método H&E.

3.2.1. Grupos experimentais

Foram utilizados cento e trinta e oito ratos durante todo o decorrer desse estudo, distribuídos em número de vinte e quatro animais no estudo piloto, e cento e catorze nos diversos grupos experimentais discriminados a seguir:

A. Grupos controles

Esses grupos foram constituídos por seis ratos cada, submetidos à mucosite intestinal por metotrexato. Os animais receberam injeções de solução salina a 0,9% (0,5 ml), administradas, por via subcutânea, diariamente, a cada doze horas durante cinco dias, sendo então, sacrificados.

B. Grupo tratado com celecoxib

Os animais, submetidos à mucosite intestinal por metotrexato, foram subdivididos em 4 grupos de seis ratos cada, os quais receberam celecoxib (Celebra[®]), nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg, respectivamente, fracionadas em partes iguais, a cada doze horas e administradas por via intra-peritoneal, até o 5º dia.

C. Grupo tratado com pentoxifilina

Os animais, submetidos à mucosite intestinal por metotrexato, foram subdivididos em 3 grupos de seis ratos cada, os quais receberam pentoxifilina (Trental[®]), nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg, respectivamente, fracionadas em partes iguais, a cada doze horas e administradas por via intra-peritoneal, até o 5º dia.

D. Grupo tratado com talidomida

Os animais, submetidos à mucosite intestinal por metotrexato, foram subdivididos em 3 grupos de seis ratos cada, os quais receberam talidomida (CEME), nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg, respectivamente, fracionadas em partes iguais, a cada doze horas e administradas por via intra-peritoneal, até o 5º dia.

3.1.2. Parâmetros avaliados

3.1.2.1. Análise da estrutura das mucosas intestinais

A. Análise morfométrica

Os animais foram sacrificados no 5º dia por deslocamento cervical e segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos, desde a porção distal do ligamento de Treitz, mais 10 cm adicionais a partir do ponto anterior e segmento proximal à válvula ileocecal, respectivamente. As amostras foram, então, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 horas e subsequentemente processadas para a técnica de coloração pelo método H&E. As medidas foram feitas através de microscópio óptico, utilizando uma ocular graduada (10x). As variáveis morfométricas analisadas incluíram altura de vilosidades, considerada a partir do topo da vilosidade até a junção vilo-cripta, e profundidade de cripta, esta definida como a invaginação entre a vilosidade adjacente. Os valores foram expressos como médias \pm erro padrão da média (epm) das relações entre vilos e respectivas criptas de 7 a 10 unidades de vilos/criptas bem orientadas por secção, expressas em μm (UNI *et al.*, 1998).

B. Análise da permeabilidade intestinal pelo teste lactulose e manitol

No 4^o dia, anterior ao sacrifício, os animais receberam 2 ml de uma solução contendo lactulose (250 mg/ml) e manitol (50 mg/ml) e foram postos em jejum. No dia seguinte, foram coletadas suas urinas em frascos contendo clorexidina (40 mg/ml), mensurados os respectivos volumes e estocados em refrigerador para as determinações de açúcares por *Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detecção Amperométrica Pulsada* (HPLC-PAD) (Barboza *et al.* 1999). Este método permite uma análise direta e com alta sensibilidade de várias moléculas de açúcar, e uma preparação de amostras extremamente simples. Como a lactulose apresenta absorção paracelular, via zonas de oclusão ou de extrusão nas pontas dos vilos, e o manitol, a absorção ocorre de forma transcelular, através dos poros aquosos presentes na membrana celular, modificações nos padrões de absorção desses dissacarídeos são indicativos de alterações na permeabilidade e na superfície absorptiva, respectivamente (Bai *et al.* 1996). A análise HPLC-PAD para os açúcares foram conduzidas utilizando o aparato Dionex BioLC e a permeabilidade intestinal foi expressa como miligrama da taxa de lactulose e manitol, e cada um sendo expresso como média \pm epm, de acordo com o percentual ingerido.

C. Estudo imunohistoquímico para detecção de TNF- α

Os animais foram sacrificados no 5^o dia por deslocamento cervical e segmentos de duodeno foram removidos. As amostras foram, então, fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 horas e subseqüentemente processadas em parafina e cortes (5 μ m) seriados foram feitos em lâminas adequadas.

Para o estudo imunohistoquímico, os cortes seriados foram desparafinizados, hidratados e imersos em tampão de citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento a 100 °C, por 15 minutos. Após o resfriamento, obtido em

temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas pelo bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3%. A seguir, a incubação com o anticorpo primário anti-TNF- α anti-rato foi feita durante a noite (*overnight*). Após a lavagem do dia seguinte, foi feita a incubação com anticorpo biotilado anti-IgG de carneiro, por 30 minutos. Durante esse período, o complexo ABC foi preparado, para incubação posterior. Após nova lavagem com PBS, uma coloração com o DAB/peróxido foi feita, seguida por uma nova contra-coloração com hematoxilina de Harry. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e as respectivas montagens das lâminas.

3.1.2.2. Análise das alterações sistêmicas dos animais

A. Análise da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corporais medidas antes de cada injeção dos tratamentos e, após estas, diariamente durante os cinco dias do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g), em relação à massa inicial.

B. Análise da variação da ingestão de líquidos

Todos os animais tiveram medidas as quantidades de água ingerida diariamente durante os cinco dias do período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de ingestão de água (ml), em relação ao consumo inicial.

C. Análise da variação da ingestão de alimentos

Todos os animais tiveram medidos os seus consumos de ração diariamente durante os cinco dias do período experimental. Os valores

encontrados foram expressos como a variação de ingestão de alimento (g), em relação ao consumo inicial.

D. Estudo hematológico

No 5º dia, os animais foram anestesiados com Hidrato de cloral a 10% (300 mg/kg; IP). Em seguida, seccionou-se a ponta da cauda do animal com uma tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e a seguinte, colhida para a confecção do esfregaço corado pelo método H&E, para as contagens diferenciais. Adicionalmente, 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Logo após, os animais foram mortos por deslocamento cervical.

3.3. Modelo de mucosite intestinal induzida em camundongos Knockout para o Receptor 1 de TNF- α

Foi utilizado o modelo de mucosite intestinal induzida por metotrexato, baseado no modelo desenvolvido por Vanderhoof *et al.*, 1990 e adaptado para camundongos *Black C57* no Laboratório de Farmacologia da Inflamação do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto. Foram feitas análises morfométricas das mucosas intestinais de camundongos *Black C57* normais e geneticamente manipulado para deficiência do gene de TNF- α , conhecidos por animais *Knockout* para o receptor 1 de TNF- α .

4. Análise estatística

A maioria dos resultados foi expressa como Média acompanhada pelo seu erro padrão (Média \pm epm). Para comparações entre os grupos foram utilizados Análise de Variância (Anova) para as medidas repetidas e teste de Bonferroni. Nas análises histopatológicas, os dados obtidos foram expressos como Mediana acompanhada pelos respectivos valores extremos do rol de dados, e os testes estatísticos aplicados foram os de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

PARTE A

1. Mucosite oral em hamsters

Foi utilizado o modelo de mucosite oral induzida por fluorouracil em hamster, desenvolvido por Sonis *et al.*, 1990 e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina–UFC. Os principais parâmetros avaliados foram: análises macroscópicas e histopatológicas das mucosas orais sob efeito do fluorouracil, bem como, dosagens de mieloperoxidase, alterações hematológicas e variações de massa corpórea dos animais após 4, 5, 10, 12, 14 e 16 dias do início da quimioterapia antineoplásica.

1.1. Efeito do 5-fluorouracil sobre as mucosas jugais

A tabela 1 mostra que a administração de fluorouracil, seguida por trauma mecânico nas mucosas jugais nos animais que receberam apenas solução fisiológica a 0,9% (Salina), causou lesão significativa ($P < 0,05$), quando comparada aos animais normais, considerados como controle (C) (Md=0; 0-0) ou aos que receberam apenas o trauma mecânico (TM) induzido por escoriações (Md=0,5; 0-1). No 4º dia não se observaram hiperemia ou eritema, e os aspectos gerais (Md=0; 0-1) foram semelhantes aos da normalidade. As lesões mostraram-se significantes somente a partir do 5º dia após o início da quimioterapia ou um dia após o trauma mecânico, verificando-se hiperemia e eritema acentuados; presença de hemorragia, de úlceras pequenas, mas ausência de abscessos (Md=2; 1-2). A seguir, a lesão atingiu seu valor máximo no 10º dia, com presença de hiperemia e eritema acentuados, de hemorragia, de úlceras extensas e abscessos (Md=3; 2-3). A partir do 12º dia, tais alterações tornaram-se significativamente ($P < 0,05$) reduzidas, onde a hiperemia e o eritema foram

considerados moderados, com hemorragia discreta; redução das úlceras e ausência de abscessos, além de áreas de tecido em cicatrização (Md=1,5; 0-2). No 14º dia a hiperemia e o eritema foram tidos como moderados, com ausência da hemorragia, das úlceras ou abscessos (Md=1; 1-1). Finalmente, no 16º dia experimental, os aspectos avaliados encontraram praticamente resolvidos (Md=0; 0-1), condizentes com as características de normalidade.

Tabela 1: Escores das análises macroscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental

	C	TM	Tempo de indução da mucosite oral					16d
			4d	5d	10d	12d	14d	
Escores	0(0-0)	0,5(0-1)	0(0-1)	2(1-2)*	3(2-3)*	1,5(0-2)*	1(1-1)*	0(0-1)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e do trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. O sacrifício foi feito em diferentes intervalos de tempo (4, 5, 10, 12, 14 e 16 dias) e os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de edema, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral em relação aos animais normais que constituem o grupo controle (C). TM indica o grupo de animais que sofreram apenas trauma mecânico no 4º dia e não receberam o quimioterápico (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

1.2. Efeito do 5-fluorouracil sobre as alterações histopatológicas das mucosas jugais

A análise histopatológica das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral e que receberam apenas solução fisiológica (não-tratados) mostrou alterações significativas ($P < 0,05$) em relação aos animais normais (controle) (Md=0; 0-0) ou aos que receberam apenas o trauma mecânico (TM) (Md=0,5; 0-1) (Tabela 2). No 4º dia experimental observaram-se epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de hemorragia, de edema, de úlceras ou abscessos (Md=0; 0-0), de forma semelhante ao observado em animais normais. A partir do 5º dia foi possível observar ingurgitamento vascular moderado; degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado com predomínio de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos; presença de áreas hemorrágicas, de edema e eventuais úlceras pequenas, porém, ausência de abscessos (Md=2; 1-2). No 10º dia experimental, correspondente ao dia do pico da mucosite, observou-se ingurgitamento e dilatação vasculares acentuadas; infiltrado celular intenso, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e de úlceras extensas (Md=3; 2-3). A partir do 12º dia verificou-se redução no grau de ingurgitamento e dilatação vasculares; do infiltrado celular, desta feita, com predomínio de leucócitos mononucleares; além da diminuição das áreas hemorrágicas, dos abscessos e das úlceras (Md=1; 0-3). No 14º dia a intensidade dos aspectos característicos da mucosite oral experimental foi menor ainda (Md=0; 0-3), praticamente desaparecendo no 16º dia (Md=0; 0-0). Em suma, as alterações histopatológicas foram significantes, atingindo seu pico no 10º dia, quando comparadas aos aspectos de normalidade (Figura 1).

Tabela 2: Escores das análises microscópicas da mucosa jugal dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental

	C	TM	Tempo de indução da mucosite oral					
			4d	5d	10d	12d	14d	16d
Escores	0(0-0)	0,5(0-1)	0(0-1)	2(1-2)*	3(2-3)*	1(0-3)*	0(0-3)	0(0-0)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de irritação mecânica (IM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. O sacrifício foi feito em diferentes intervalos de tempo (4, 5, 10, 12, 14 e 16 dias) e os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença de infiltrado celular; de vasodilatação e ingurgitamento vasculares, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral em relação aos animais normais que constituem o grupo controle (C). TM indica o grupo de animais que sofreram apenas irritação mecânica no 4º dia e não receberam o quimioterápico (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

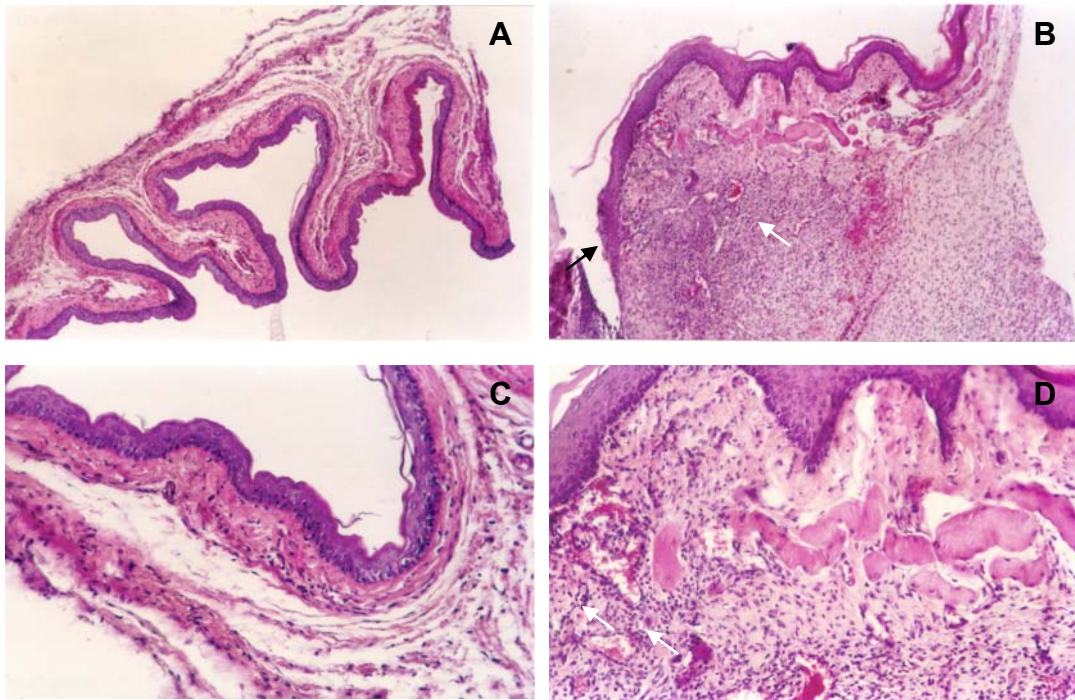


Figura 1 Fotomicrografia da mucosa oral de hamsters normais (A e C) e apenas submetidos a mucosite oral (B e D): Os hamsters foram submetidos a mucosite oral através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais e no 10º dia foram sacrificados. Suas mucosas jugais foram removidas, fixadas em formol a 10% e processadas para coloração H&E. **(A e C):** mucosas jugais dos animais normais, não submetidos a mucosite oral. **(B e D):** mucosas jugais dos animais que receberam sc 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, mostrando dilatação e ingurgitamento vasculares; intenso infiltrado celular (seta branca); presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras (seta preta). (A e B=40x; C e D=100x).

Em função dos dados obtidos, o 10º dia foi escolhido para o estudo dos efeitos dos tratamentos com celecoxib, indometacina, pentoxifilina e talidomida. As características histopatológicas que correspondem ao infiltrado celular acentuado com predomínio de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos podem ser conferidas pela fotomicrografia 1B, comparando-a com a fotomicrografia 1A, que representa uma mucosa jugal normal (Figura 1).

1.3. Efeito do 5-fluorouracil sobre a medida de atividade de mieloperoxidase das mucosas jugais

A figura 2 mostra que a administração de fluorouracil, seguida por trauma mecânico nas mucosas jugais nos animais que receberam apenas solução fisiológica a 0,9% (Salina), foi capaz de causar um aumento significativo ($P < 0,05$) no número de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos nas mucosas jugais dos animais, quantificados, indiretamente, no 10^o dia, através da medida de atividade de suas enzimas mieloperoxidases, em comparação às quantidades dos animais normais ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral.

1.4. Efeito do 5-fluorouracil sobre o leucograma dos hamsters

Na figura 3 verifica-se que o fluorouracil causou alterações significantes ($P < 0,05$) tanto na contagem total, como na diferencial dos leucócitos sangüíneos dos hamsters. Tais variações tiveram o seguinte curso: leucopenia nos 4^o e 5^o dias e um pico de leucocitose no 10^o dia, às custas do aumento no número de neutrófilos ($P < 0,05$), seguida por uma tendência ao retorno dos níveis normais a partir do 12^o dia.

1.5. Efeito do 5-fluorouracil sobre a variação de massa corpórea dos hamsters

A figura 4 mostra que a mucosite oral induzida por fluorouracil em hamsters foi capaz de causar perda significativa ($P < 0,05$) de massa corpórea a partir do 5^o dia, mantendo esse perfil até o 10^o dia experimental, quando então, os animais começam a mostrar uma tendência a menor perda de massa corporal, em comparação à variação de massa corpórea dos animais normais ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral.

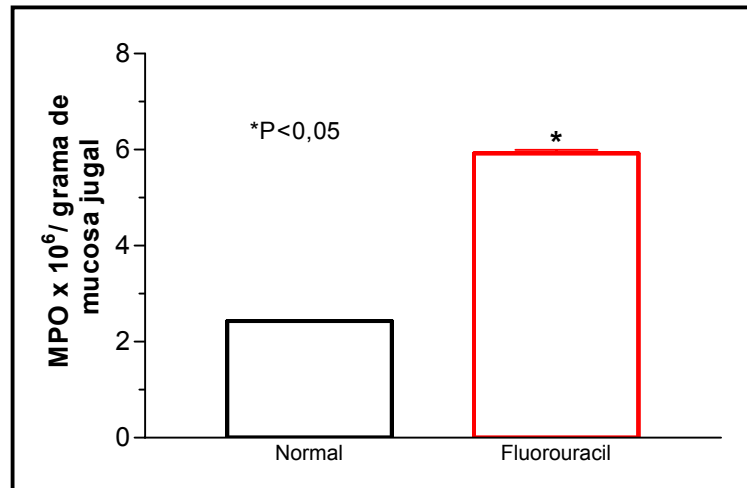


Figura 2: Efeito do 5-fluorouracil sobre a medida de atividade de mieloperoxidase das mucosas jugais: A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico. As mucosas foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no 10 dia e congeladas em freezer 20° negativos. As barras representam Média ± EPM da quantidade de MPO x 10⁶/grama de mucosa jugal. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral (5-FU) em relação aos animais normais (controle). O número de animais utilizados foi, no mínimo, três (Teste t).

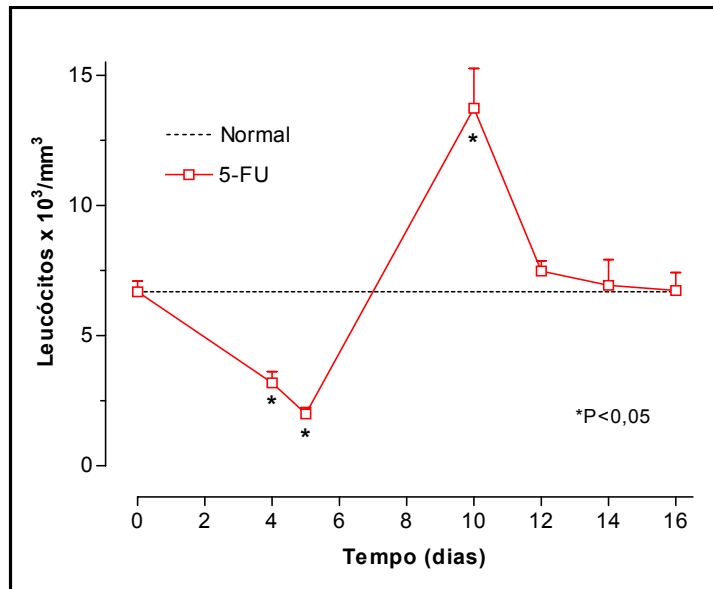


Figura 3: Efeito do 5-fluorouracil sobre o leucograma dos hamsters: A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. O sangue foi colhido por punção cardíaca por ocasião dos sacrifícios realizados em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 5, 10, 12, 14 e 16 dias). Os pontos representam Média \pm EPM do número total de leucócitos $\times 10^3/\text{mm}^3$. * $P < 0,05$ representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral (5-FU) em relação aos animais normais (controle). O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco (Teste t).

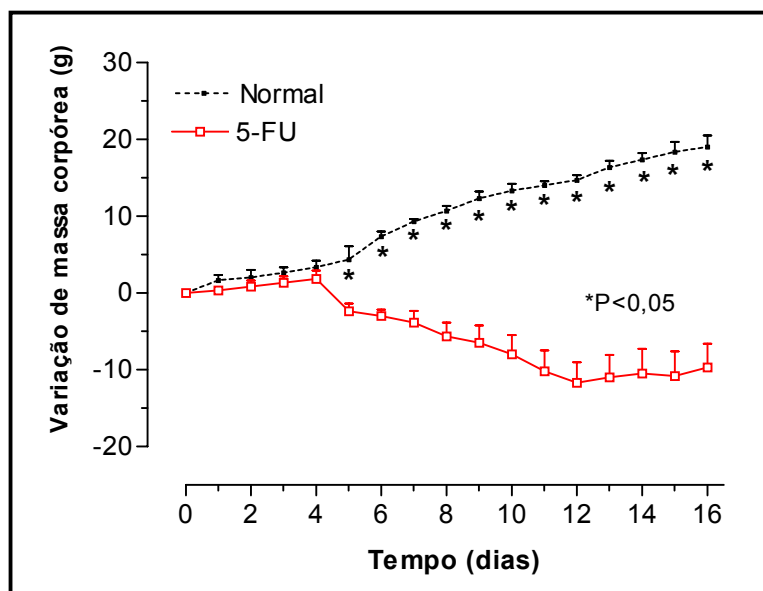


Figura 4: Efeito do 5-fluorouracil sobre a Variação de Massa Corpórea dos Hamsters: A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. As massas corpóreas dos animais foram medidas imediatamente antes das injeções de 5-FU ou do TM e diariamente até o 16º dia. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas dos hamsters, durante 16 dias, em relação a suas massas iniciais. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais submetidos à mucosite oral experimental em relação aos hamsters normais, sem mucosite oral (Normal). O número de animais utilizados em cada ponto foi, no mínimo, seis. (Teste t).

2. Efeito dos tratamentos farmacológicos nos grupos experimentais

O modelo de mucosite oral induzida por fluorouracil em hamster, desenvolvido por Sonis *et al.*, 1990 e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina–UFC, foi utilizado para o estudo dos efeitos dos tratamentos com celecoxib, indometacina, pentoxifilina e talidomida sobre os parâmetros avaliados no 10^o dia: análises macroscópicas e histopatológicas das mucosas orais sob efeito do fluorouracil, bem como, medidas de atividade de mieloperoxidase, alterações hematológicas e variações de massa corpórea dos animais. Adicionalmente, foram analisadas lesões gástricas dos animais submetidos a mucosite oral e tratados com celecoxib ou indometacina.

2.1. Tratamento com celecoxib

2.1.1. Efeito do celecoxib sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral dos hamsters

A tabela 3 mostra o efeito do tratamento com celecoxib (CLX) nas doses de 7,5; 15 e 30 mg/kg ou com solução salina a 0,9%, administradas por via sub-cutânea, 1 hora antes de cada dose de fluorouracil ou das escoriações nas mucosas jugais e, diariamente, até o 10^o dia experimental. Observou-se que o CLX foi capaz de inibir, de forma significativa ($P < 0,05$) e inversamente dose-dependente, as principais alterações vistas na mucosite oral experimental, aqui representadas pela presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de edema, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. Na figura 5, observam-se os aspectos macroscópicos das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral no 10^o dia. A fotografia C ilustra o efeito protetor do tratamento com CLX na dose 7,5 mg/kg, quando comparado à ação do 5-fluorouracil (fotografia B) ou ao aspecto de normalidade (fotografia A).

Tabela 3: Efeito do celecoxib sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Controle	Salina	CLX 7,5	CLX 15	CLX 30
Escores	0(0-0)	3(2-3)	1(1-1)*	1(1-2)*	3(2-3)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam CLX (7,5, 15 e 30 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com CLX em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

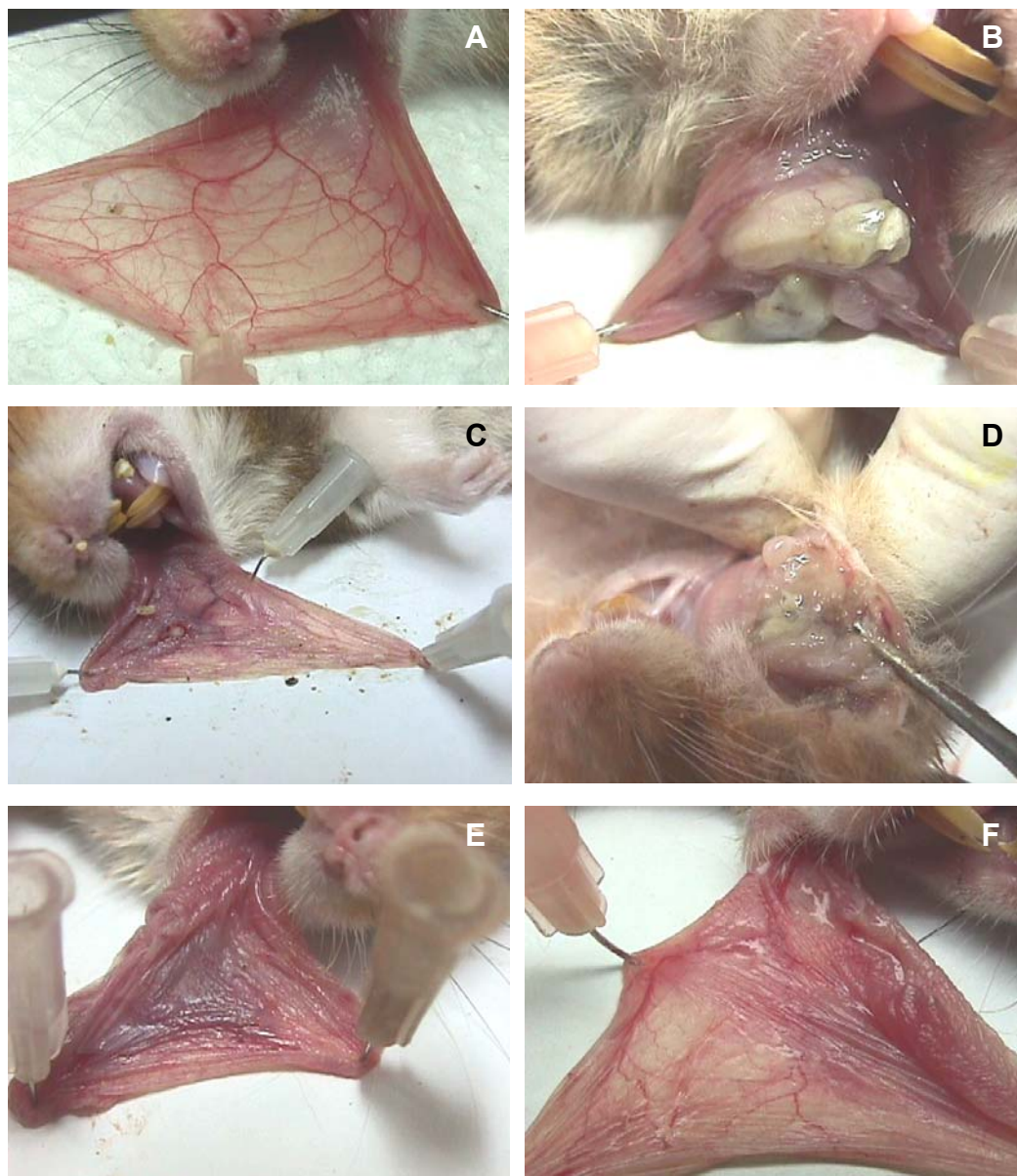


Figura 5: Aspectos macroscópicos de mucosas jugais de hamsters normais (A) ou submetidos a mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil seguida de TM e que foram tratados com salina (B), CLX 7,5 mg/kg (C), IND 0,25 mg/kg (D), PTX 45mg/kg (E) ou TLD 10 mg/kg (F): A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam CLX, IND, PTX ou TLD 7,5, 0,25, 45 ou 10 mg/kg-sc, respectivamente ou 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do TM, diariamente, durante 10 dias, quando então, foram sacrificados e devidamente fotografados.

2.1.2. Efeito do celecoxib sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters

A tabela 4 mostra as alterações observadas na análise histopatológica das mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por fluorouracil e tratados com celecoxib. Os animais receberam CLX (7,5; 15 e 30 mg/kg; sc) ou solução salina 0,9% (0,5 ml; sc) diariamente, e foram sacrificados no 10^o dia. A partir de cortes seriados das mucosas, observou-se que o tratamento com CLX reduziu, de forma significativa, porém, inversamente dose-dependente, as alterações histopatológicas vistas na mucosite oral experimental, quando comparadas às observadas em animais não-tratados, mas submetidos à mucosite oral (Salina). A figura 6 ilustra o aspecto microscópico de uma mucosa jugal normal (A), com mucosite oral experimental (B) e com mucosite oral experimental tratada com CLX 7,5 mg/kg (C), dose na qual se observou melhora dos resultados como redução do infiltrado celular e da intensidade dos demais aspectos analisados.

2.1.3. Efeito do celecoxib sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters

A figura 7 mostra que o tratamento com CLX, nas doses menores de 7,5 e 15 mg/kg (sc), reduziu, de forma significativa ($P < 0,05$), o número de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos nas mucosas jugais dos animais, quantificados, indiretamente, no 10^o dia, através da medida de atividade de sua enzima mieloperoxidase, quando comparadas às quantidades dessa enzima em animais normais ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral.

Tabela 4: Efeito do celecoxib sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Controle	Salina	CLX 7,5	CLX 15	CLX 30
Escores	0(0-0)	3(2-3)	1(1-1)*	2(1-2)*	3(1-3)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam CLX (7,5, 15 e 30 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com CLX em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

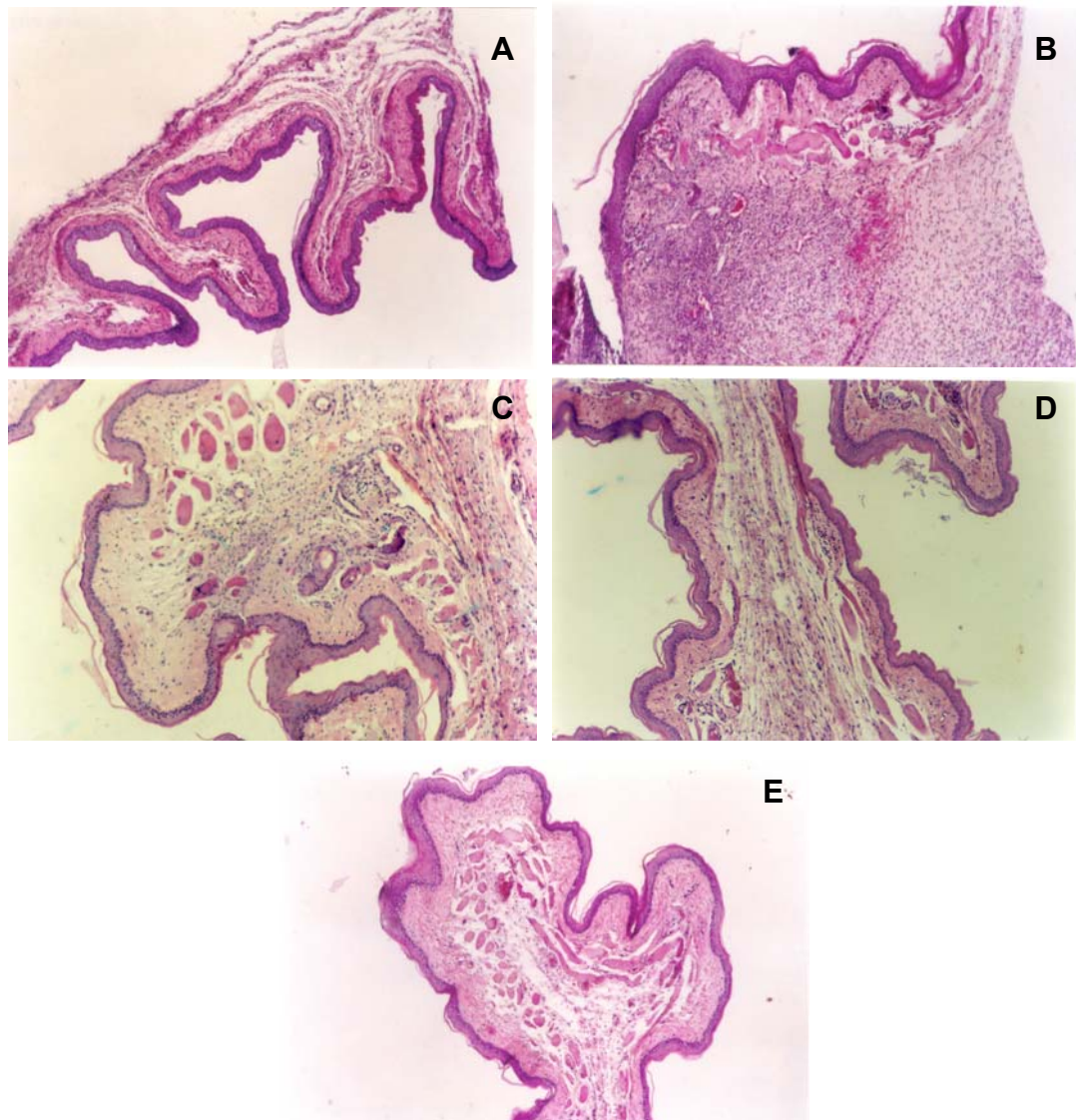


Figura 6: aspecto microscópico de uma mucosa jugal normal (A) ou com mucosite oral experimental recebendo solução salina (B), CLX 7,5 mg/kg (C), PTX 45 mg/kg (D) e TLD 10 mg/kg (E): A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam CLX, PTX e TLD, nas doses de 7,5, 45 e 10 mg/kg-sc, respectivamente ou 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do TM, diariamente, durante 10 dias, quando então, foram sacrificados e as mucosas jugais devidamente processadas para H&E. (40x).

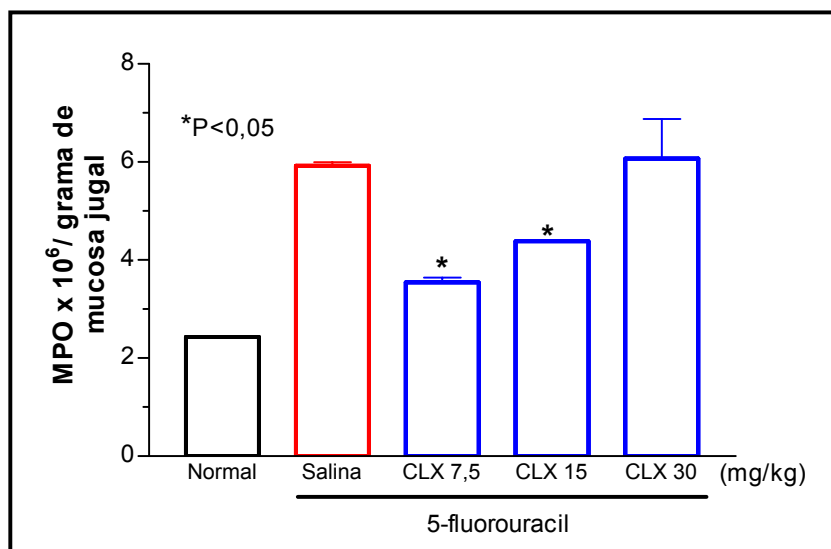


Figura 7: Efeito do celecoxib sobre as medidas de atividade de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters: A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina ou CLX (7,5, 15 e 30 mg/kg) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do TM. As mucosas foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no 10 dia e congeladas em freezer 20° negativos. As barras representam Média ± EPM da quantidade de MPO x 10⁶/grama de mucosa jugal. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral (5-FU) em relação aos animais normais. O número de animais utilizados foi, no mínimo, três (Anova; Bonferroni).

2.1.4. Efeito do celecoxib sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

Na tabela 5 observa-se que o tratamento com CLX, nas doses de 7,5; 15 e 30 mg/kg (sc), não foi capaz de alterar as contagens do número de leucócitos total e diferencial do sangue dos animais. Dessa maneira, o CLX não reduziu a leucocitose, nem o número de neutrófilos no 10^o dia em hamsters submetidos à mucosite oral experimental por fluorouracil (P<0,05).

2.1.5. Efeito do celecoxib sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral

A figura 8 mostra que o tratamento com CLX não reverteu de forma significativa (P<0,05) a perda de massa corpórea induzida pela mucosite oral experimental, quando comparada à variação de massa corpórea de animais normais ou seja, sem mucosite. Contudo, observa-se que doses menores de CLX induziram uma tendência à recuperação de suas massas, embora sem haver diferença significante, quando relacionadas às massas dos animais submetidos a mucosite oral experimental não-tratada (Salina).

2.1.6. Efeito do celecoxib sobre as úlceras das mucosas gástricas de animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil

A tabela 6 mostra que o tratamento com CLX preveniu o surgimento de úlceras gástricas em animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil e trauma mecânico nas mucosas jugais, analisadas no 10^o dia, por ocasião do sacrifício dos mesmos, de acordo com os critérios de Szabo *et al.*, 1985, onde foram consideradas perdas de pregas da mucosa, descoloração, edema, presença de hemorragia, número de petéquias e intensidade de ulcerações. A figura 9 ilustra os aspecto macroscópico das mucosas gástricas de animais normais, com mucosite oral por fluorouracil sem tratamento ou tratados com celecoxib ou indometacina.

Tabela 5: Efeito do celecoxib sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

	Tratamento (mg/kg)				
	Normal	Salina	CLX 7,5	CLX 15	CLX 30
Leucócitos totais	7,5±0,6	25,1±3,7	17,9±0,7	17,4±2,2	16,9±2,4
Neutrófilos	1,8±0,2	17,3±2,5	12,3±0,7	11,8±1,7	9,8±1,6*
Mononucleares	5,9±0,4	8,4±2,0	5,6±0,7	5,7±0,6	7,8±1,4

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina ou CLX uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. O sangue foi colhido por punção cardíaca por ocasião do sacrifício realizado no 10^o dia. Os valores representam Média ± EPM do número total de leucócitos x 10³/mm³. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil e tratados com CLX, em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

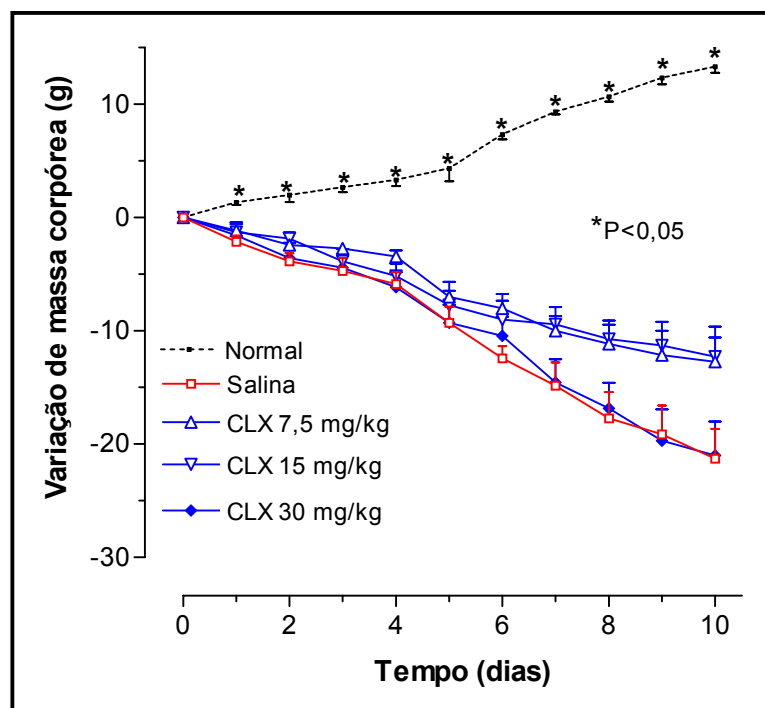


Figura 8: Efeito do celecoxib (CLX) sobre a variação de massa corpórea de hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil: A mucosite oral, induzida por doses (ip) de 5-fluorouracil e pelo trauma mecânico nas mucosas jugais dos animais, causou intensa perda de massa corpórea, a qual não foi revertida de forma estatisticamente significativa pelo uso de celecoxib (7,5, 15 e 30 mg/kg; sc). As massas corpóreas dos animais foram medidas diariamente, durante 10 dias. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de massas corpóreas (g), calculadas a partir das massas iniciais. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-FU tratada com CLX em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais em cada grupo foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

Tabela 6: Efeito do tratamento com celecoxib sobre as úlceras das mucosas gástricas de animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil:

Grupo	Normal	Salina	CLX 7,5
Escores	1 (1-4)	5,5 (0-11)	2 (1-6)*

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam CLX (7,5 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, do número e tamanho de úlceras gástricas, analisadas de acordo com os critérios de Szabo *et al.*, 1985. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com CLX em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

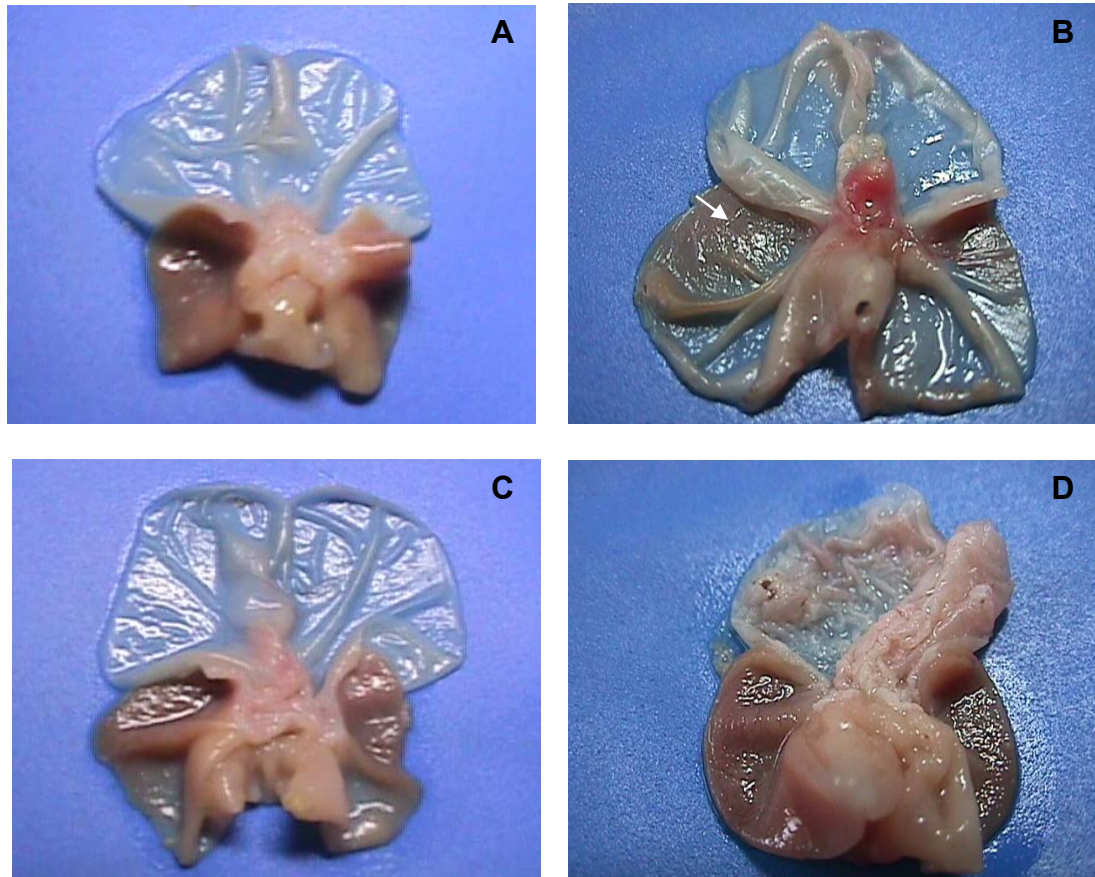


Figura 9: Aspectos macroscópicos de mucosas gástricas de hamsters normais (A) ou submetidos a mucosite oral induzida por 5-Fluorouracil seguida de TM e que foram tratados com salina (B), CLX 7,5 mg/kg (C) ou IND 1,0 mg/kg (D): A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam CLX e IND 7,5 e 0,25 mg/kg-sc, respectivamente ou 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do TM, diariamente, durante 10 dias. Os animais foram, então, sacrificados, seus estômagos retirados, abertos ao longo da grande curvatura, tratados de acordo com o método de Szabo e colaboradores, 1985, para conseqüente evidênciação e avaliações das lesões, onde foram consideradas perdas de pregas da mucosa, descoloração, edema (e), presença de hemorragia (h), número de petéquias e intensidade de ulcerações (seta). Demais detalhes somente são visualizados de acordo com o manuseio das peças.

2.2. Tratamento com indometacina

2.2.1. Efeito da indometacina sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral dos hamsters

A tabela 7 mostra o efeito do tratamento com indometacina (IND) nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg ou com solução salina a 0,9%, administradas por via sub-cutânea, 1 hora antes de cada dose de fluorouracil ou do trauma mecânico nas mucosas jugais e, diariamente, até o 10^o dia. Observou-se que a IND não foi capaz de inibir, de forma significativa ($P < 0,05$), as principais alterações vistas na mucosite oral experimental, aqui representadas pela presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de edema, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. Na figura 5, observam-se os aspectos macroscópicos das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral no 10^o dia. A fotografia D ilustra o efeito do tratamento com IND na dose 0,25 mg/kg, quando comparado à ação do 5-fluorouracil (fotografia B) ou ao aspecto de normalidade (fotografia A).

2.2.2. Efeito da indometacina sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters:

A tabela 8 mostra as alterações observadas na análise histopatológica das mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por fluorouracil. Os animais receberam IND (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg-sc) ou solução salina 0,9% (0,5 ml; sc) diariamente, e foram sacrificados no 10^o dia. A partir de cortes seriados das mucosas, observou-se que o tratamento com IND não foi capaz de reduzir, de forma significativa, as alterações histopatológicas vistas na mucosite oral experimental, quando comparadas às observadas em animais não-tratados (Salina). A figura 6 ilustra o aspecto microscópico de uma mucosa jugal normal (A), com mucosite oral experimental (B) e com mucosite oral experimental tratada com IND 0,25 mg/kg (D), onde se observa intenso infiltrado celular e demais aspectos analisados.

Tabela 7: Efeito da indometacina sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Controle	Salina	IND 0,25	IND 0,5	IND 1,0
Escores	0(0-0)	3(2-3)	3(2-3)	3(2-3)	3(2-3)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam IND (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com IND em relação aos animais não tratados, que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

Tabela 8: Efeito da indometacina sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Controle	Salina	IND 0,25	IND 0,5	IND 1,0
Escores	0(0-0)	3(2-3)	3(2-3)	3(2-3)	3(2-3)

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam IND (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com IND em relação aos animais não tratados, que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

2.2.3. Efeito da indometacina sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

A tabela 9 mostra que o tratamento com IND, nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg (sc), não foi capaz de alterar as contagens do número de leucócitos total e diferencial do sangue dos animais. Dessa maneira, a IND não reduziu a leucocitose, nem o número de neutrófilos no 10^o dia, em hamsters submetidos a mucosite oral experimental por fluorouracil (P<0,05).

2.2.4. Efeito da indometacina sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral

A figura 10 mostra que o tratamento com IND não reverteu de forma significativa (P<0,05) a perda de massa corpórea induzida pela mucosite oral experimental, quando comparada à variação de massa corpórea de animais normais ou seja, sem mucosite. Entretanto, observa-se que a maior dose de IND induziu uma tendência a maior perda de suas massas, embora sem haver diferença estatisticamente significativa, quando relacionada às massas dos animais submetidos a mucosite oral experimental não-tratada (Salina).

2.2.5. Efeito da indometacina sobre as úlceras das mucosas gástricas de animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil

A tabela 10 mostra que o tratamento com IND favoreceu o surgimento de úlceras gástricas em animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil e trauma mecânico nas mucosas jugais, analisadas no 10^o dia, por ocasião do sacrifício dos mesmos, de acordo com os critérios de Szabo *et al.*, 1985. Adicionalmente, a dose de 1,0 mg/kg de IND causou um maior espessamento da mucosa, além da presença aumentada do número de úlceras.

Tabela 9: Efeito da indometacina sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

	Tratamento (mg/kg)				
	Normal	Salina	IND 0,25	IND 0,5	IND 1,0
Leucócitos totais	7,5±0,6	25,1±3,7	21,3±3,8	24,2±3,8	25,8±3,0
Neutrófilos	1,8±0,2	17,3±4,9	15,3±3,4	16,7±1,7	17,0±2,1
Mononucleares	5,9±0,4	7,8±1,3	5,9±1,5	7,5±1,0	8,2±0,0

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. O sangue foi colhido por punção cardíaca por ocasião do sacrifício realizado no 10º dia. Os valores representam Média ± EPM do número total de leucócitos x 10³/mm³. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil e tratados com IND, em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

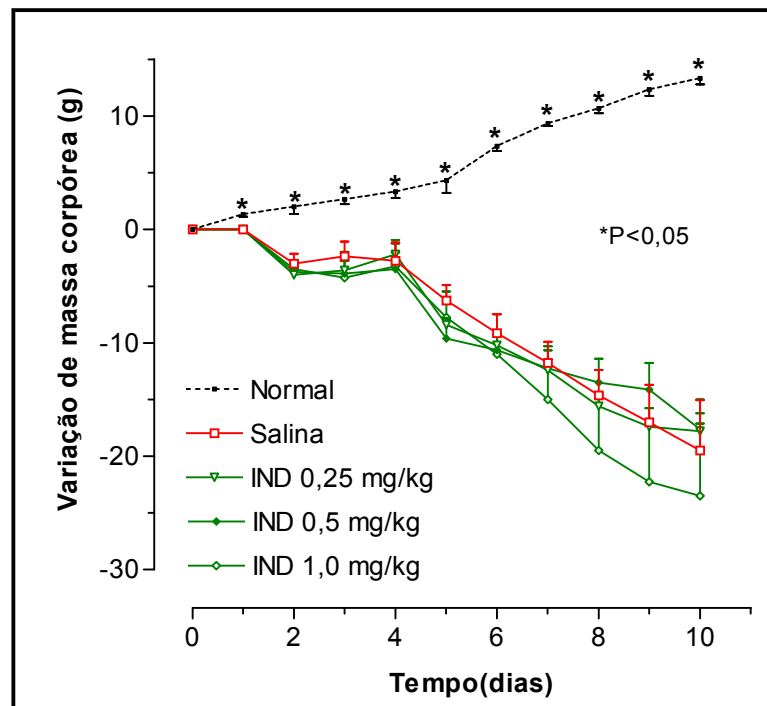


Figura 10: Efeito da indometacina (IND) sobre a variação de massa corpórea de hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil: A mucosite oral, induzida por doses (ip) de 5-fluorouracil pelo trauma mecânico nas mucosas jugais dos animais, causou intensa perda de massa corpórea, a qual não foi revertida de forma estatisticamente significativa pelo uso de IND (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg; sc). As massas corpóreas dos animais foram medidas diariamente, durante 10 dias. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de massas corpóreas (g), calculadas a partir das massas iniciais. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-FU tratada com IND em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais em cada grupo foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

Tabela 10: Efeito do tratamento com indometacina sobre as úlceras das mucosas gástricas de animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil:

Grupo	Normal	Salina	IND 0,25	IND 0,5	IND 1,0
Escores	1 (1-4)	5,5 (0-11)	18 (10-22)*	17,5 (10-25)*	18 (15-21)*

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam IND (0,25, 0,5 e 1,0 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, do número e tamanho de úlceras gástricas, analisadas de acordo com os critérios de Szabo *et al.*, 1985. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral e tratados com IND em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

2.3. Tratamento com pentoxifilina

2.3.1. Efeito da pentoxifilina sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral dos hamsters

A tabela 11 mostra o efeito do tratamento com pentoxifilina (PTX) nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg ou com solução salina a 0,9%, administradas por via sub-cutânea, 1 hora antes de cada dose de fluorouracil ou do trauma mecânico nas mucosas jugais e, diariamente, até o 10^o dia. Observou-se que a PTX foi capaz de inibir, de forma significativa ($P < 0,05$) e dose-dependente, as principais alterações vistas na mucosite oral experimental, aqui representadas por eritema, hiperemia, edema, hemorragia, úlceras e abscessos. Na figura 5, observam-se os aspectos macroscópicos das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral no 10^o dia. A fotografia E ilustra o efeito protetor do tratamento com PTX na dose 45 mg/kg, quando comparado à ação do 5-fluorouracil (fotografia B) ou ao aspecto de normalidade (fotografia A).

2.3.2. Efeito da pentoxifilina sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters

A tabela 12 mostra as alterações observadas na análise histopatológica das mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por fluorouracil. Os animais receberam PTX (5, 15 e 45 mg/kg-sc) ou solução salina 0,9% (0,5 ml; sc) diariamente, e foram sacrificados no 10^o dia. A partir de cortes seriados das mucosas, observou-se que PTX foi capaz de reduzir, de forma significativa e dose-dependente, as alterações histopatológicas vistas na mucosite oral experimental, quando comparadas às observadas em animais não-tratados (Salina). A figura 6 ilustra o aspecto microscópico de uma mucosa jugal normal (A), com mucosite oral experimental (B) e com mucosite oral experimental tratada com PTX 45 mg/kg (E), onde se observa redução do infiltrado celular e demais aspectos analisados.

Tabela 11: Efeito da pentoxifilina sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Controle	Salina	PTX 5	PTX 15	PTX 45
Escores	0 (0-0)	3 (2-3)	1 (1-3)*	1(1-3)*	1 (1-2)*

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam PTX (5, 15 e 45 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com PTX em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

Tabela 12: Efeito da pentoxifilina sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Controle	Salina	PTX 5	PTX 15	PTX 45
Escores	0 (0-0)	3 (2-3)	1 (0-2)*	2 (0-3)*	1 (1-3)*

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam PTX (5, 15 e 45 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com PTX em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

2.3.3. Efeito da pentoxifilina sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters

A figura 11 mostra que, apesar das menores doses de pentoxifilina não terem reduzido os níveis de mieloperoxidase, o tratamento com PTX (45 mg/kg-sc), reduziu, de forma significativa ($P < 0,05$), o número de neutrófilos nas mucosas jugais dos animais no 10^o dia, quantificados, de forma indireta através da medida de atividade de suas enzimas mieloperoxidasas, quando comparadas às quantidades de neutrófilos de animais normais ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral.

2.3.4. Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

A tabela 13 mostra que o tratamento com PTX, na maior dose (45 mg/kg-sc), foi capaz de alterar as contagens do número de leucócitos total e diferencial do sangue dos animais. Dessa maneira, a PTX reduziu a leucocitose e o número de neutrófilos no 10^o dia em hamsters submetidos à mucosite oral experimental por fluorouracil ($P < 0,05$).

2.3.5. Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral

A figura 12 mostra que o tratamento com PTX, nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, reduziu, de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$) e dose-dependente, a perda de massa corpórea dos animais induzida pela mucosite oral experimental quando comparada à variação de massa corpórea de animais não tratados, constituídos pelo grupo Salina.

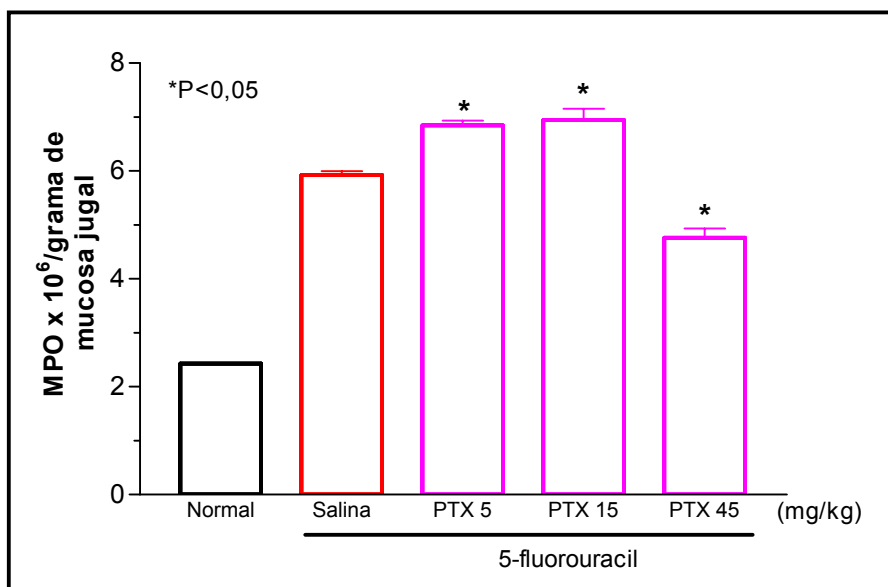


Figura 11: Efeito da pentoxifilina sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters: A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do TM. As mucosas foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no 10 dia e congeladas em freezer 20° negativos. As barras representam Média \pm EPM da quantidade de MPO x 10⁶/grama de mucosa jugal. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral (5-FU) em relação aos animais normais (controle). O número de animais utilizados foi, no mínimo, três (Anova; Bonferroni).

Tabela 13: Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

	Tratamento (mg/kg)				
	Normal	Salina	PTX 5	PTX 15	PTX 45
Leucócitos totais	7,8±0,5	25,1±3,7	12,0±0,7*	11,0±0,9*	9,4±0,4*
Neutrófilos	1,9±0,2	17,3±4,9	6,8±0,6*	4,6±0,6*	3,1±0,5*
Mononucleares	5,9±0,4	7,8±1,3	5,4±0,7	6,4±0,4	6,3±0,5

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. O sangue foi colhido por punção cardíaca por ocasião do sacrifício realizado no 10^o dia. Os valores representam Média ± EPM do número total de leucócitos x 10³/mm³. *P<0,001 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil e tratados com PTX, em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

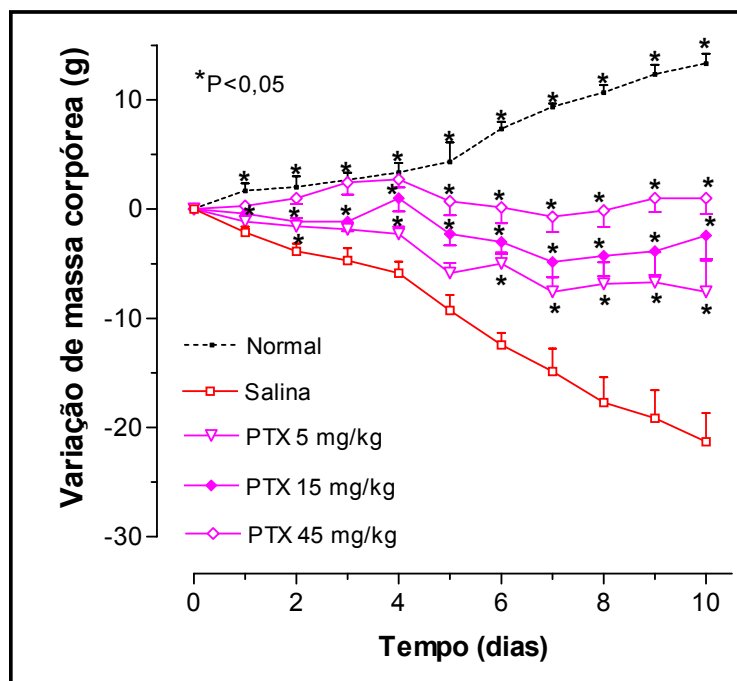


Figura 12: Efeito da pentoxifilina sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil: A mucosite oral, induzida por doses (ip) de 5-fluorouracil e pelo trauma mecânico nas mucosas jugais dos animais, causou intensa perda de massa corpórea, a qual foi revertida, de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$) e dose-dependente, pelo uso de PTX (5, 15 e 45 mg/kg; sc). As massas corpóreas dos animais foram medidas diariamente, durante 10 dias. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de massas corpóreas (g), calculadas a partir das massas iniciais. $*P < 0,05$ representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-FU tratada com PTX em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais em cada grupo foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

2.4. Tratamento com talidomida

2.4.1. Efeito da talidomida sobre os aspectos macroscópicos observados na mucosite oral dos hamsters

A tabela 14 mostra o efeito do tratamento com talidomida (TLD) nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg ou com solução salina a 0,9%, administradas por via sub-cutânea, 1 hora antes de cada dose de fluorouracil ou do trauma mecânico nas mucosas jugais e, diariamente, até o 10^o dia. Observou-se que a TLD foi capaz de inibir, de forma significativa ($P < 0,05$), as principais alterações vistas na mucosite oral experimental, aqui representadas por eritema, hiperemia, edema, hemorragia, úlceras e abscessos. Na figura 5, observam-se os aspectos macroscópicos das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral no 10^o dia. A fotografia F ilustra o efeito protetor do tratamento com TLD na dose 90 mg/kg, quando comparado à ação do 5-fluorouracil (fotografia B) ou ao aspecto de normalidade (fotografia A).

2.4.2. Efeito da talidomida sobre as alterações histológicas observadas na mucosite oral em hamsters

A tabela 15 mostra as alterações observadas na análise histopatológica das mucosas jugais de hamsters submetidos a mucosite oral por fluorouracil. Os animais receberam TLD (10, 30 e 90 mg/kg-sc) ou solução salina 0,9% (0,5 ml; sc) diariamente, e foram sacrificados no 10^o dia. A partir de cortes seriados das mucosas, observou-se que TLD foi capaz de reduzir, de forma significativa e dose-dependente, as alterações histopatológicas vistas na mucosite oral experimental, quando comparadas às observadas em animais não-tratados (Salina). A figura 6 ilustra o aspecto microscópico de uma mucosa jugal normal (A), com mucosite oral experimental (B) e com mucosite oral experimental tratada com TLD 90 mg/kg (F), onde se observa redução do infiltrado celular e dos demais aspectos analisados.

Tabela 14: Efeito da talidomida sobre as alterações macroscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Normal	Salina	TLD 10	TLD 30	TLD 90
Escores	0 (0-0)	3 (2-3)	1 (1-2)*	1(1-2)*	1 (1-2)*

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam TLD (10, 30 e 90 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de hemorragia, de úlceras e de abscessos. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com TLD em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

Tabela 15: Efeito da talidomida sobre as alterações microscópicas das mucosas jugais dos hamsters submetidos a mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil

	Tratamento (mg/kg)				
	Normal	Salina	TLD 10	TLD 30	TLD 90
Escores	0 (0-0)	3 (2-3)	1,5 (1-2)*	1,5 (1-2)*	1,5 (1-2)*

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam TLD (10, 30 e 90 mg/kg-sc) ou 0,5 ml de solução salina 0,9% (Salina) uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do trauma mecânico, diariamente, durante 10 dias. Os dados representam mediana e variação de pelo menos 6 hamsters, dos seguintes parâmetros analisados: dilatação e ingurgitamento vasculares; intensidade de infiltrado celular; presença de áreas hemorrágicas; de edema, de abscessos e de úlceras. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais com mucosite oral tratados com TLD em relação aos animais não tratados que constituem o grupo Salina (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).

2.4.3. Efeito da talidomida sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters

A figura 13 mostra que o tratamento com TLD (10 mg/kg-sc), reduziu, de forma significativa ($P < 0,05$), o número de neutrófilos nas mucosas jugais dos animais no 10^o dia, quantificados, de forma indireta através da medida de atividade de suas enzimas mieloperoxidasas, quando comparadas às quantidades de neutrófilos de animais normais ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral.

2.4.4. Efeito da talidomida sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

A tabela 16 mostra que o tratamento com TLD (10, 30 e 90 mg/kg-sc), foi capaz de alterar as contagens do número de leucócitos total e diferencial do sangue dos animais. Dessa maneira, a TLD reduziu a leucocitose e o número de neutrófilos e mononucleares no 10^o dia em hamsters submetidos à mucosite oral experimental por fluorouracil ($P < 0,05$).

2.4.5. Efeito da talidomida sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral

A figura 14 mostra que o tratamento com TLD, nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, não reduziu, de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$), a perda de massa corpórea dos animais induzida pela mucosite oral experimental quando comparada à variação de massa corpórea de animais não tratados, constituídos pelo grupo Salina.

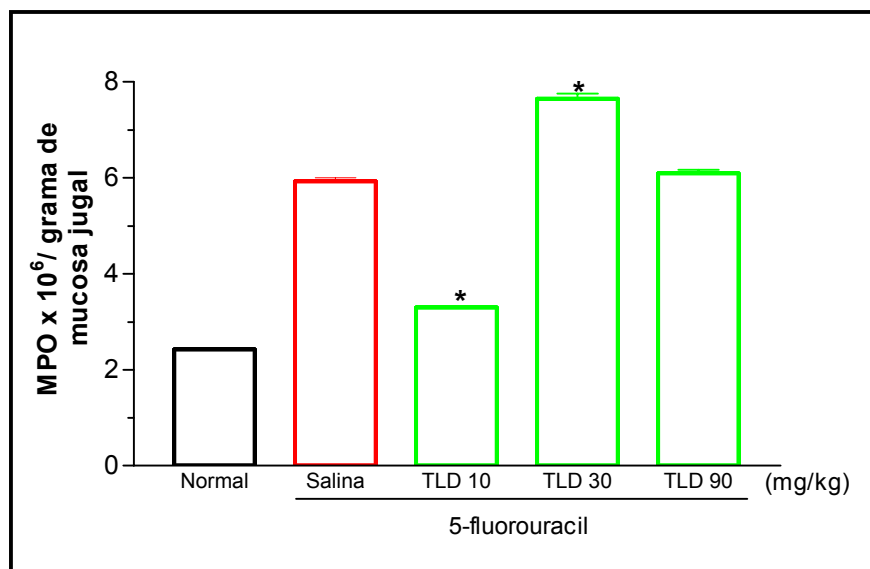


Figura 13: Efeito da talidomida sobre as dosagens de mieloperoxidase observadas na mucosite oral em hamsters: A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou do TM. As mucosas foram retiradas por ocasião dos sacrifícios realizados no 10 dia e congeladas em freezer 20° negativos. As barras representam Média ± EPM da quantidade de MPO x 10⁶/grama de mucosa jugal. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral (5-FU) em relação aos animais normais (controle). O número de animais utilizados foi, no mínimo, três (Anova; Bonferroni).

Tabela 16: Efeito da talidomida sobre o leucograma dos hamsters com mucosite oral

	Tratamento (mg/kg)				
	Normal	Salina	TLD 10	TLD 30	TLD 90
Leucócitos totais	7,8±0,5	26,2±2,7	11,2±1,7*	13,1±0,9*	16,2±2,1*
Neutrófilos	1,9±0,2	12,6±1,2	5,1±1,1*	7,8±1,1*	10,3±1,6
Mononucleares	5,9±0,4	13,6±1,8	6,1±1,2*	5,3±0,6*	5,9±1,2*

A mucosite oral foi induzida em hamsters através de injeções de 5-fluorouracil e de trauma mecânico (TM) com o auxílio de agulha de ponta romba nas mucosas jugais. Os animais receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de 5-fluorouracil ou da irritação mecânica. O sangue foi colhido por punção cardíaca por ocasião do sacrifício realizado no 10^o dia. Os valores representam Média ± EPM do número total de leucócitos x 10³/mm³. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-fluorouracil e tratados com TLD, em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

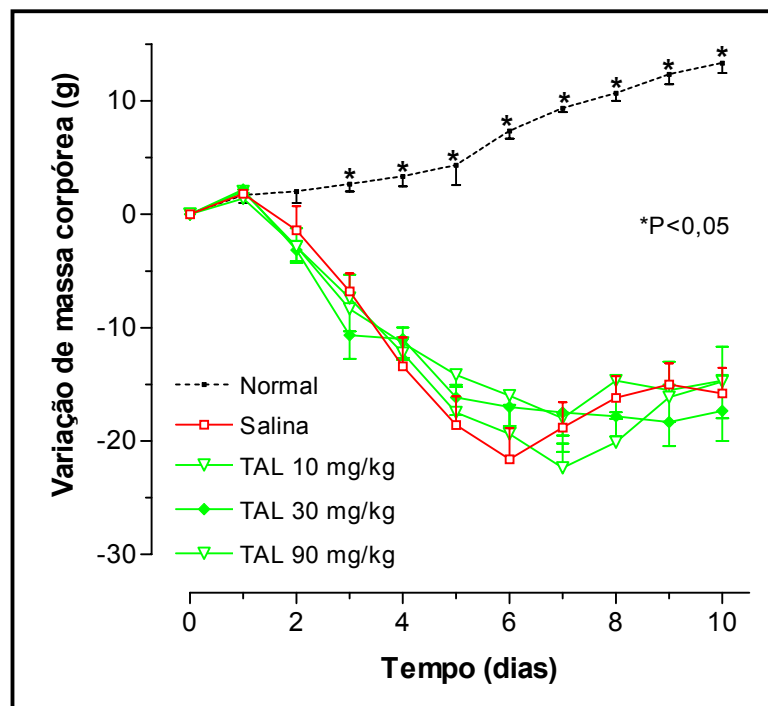


Figura 14: Efeito da talidomida sobre a variação de massa corpórea dos hamsters com mucosite oral experimental induzida por 5-fluorouracil: A mucosite oral, induzida por doses (ip) de 5-fluorouracil e pelo trauma mecânico nas mucosas jugais dos animais, causou intensa perda de massa corpórea, a qual foi revertida, de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$) e dose-dependente, pelo uso de TLD (10, 30 e 90 mg/kg; sc). As massas corpóreas dos animais foram medidas diariamente, durante 10 dias. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de massas corpóreas (g), calculadas a partir das massas iniciais. $*P < 0,05$ representa diferenças estatísticas dos hamsters que foram submetidos a mucosite oral por 5-FU tratada com TLD em relação aos animais não tratados (Salina). O número de animais em cada grupo foi, no mínimo, seis (Anova; Bonferroni).

PARTE B

1. Mucosite intestinal em ratos

Foi utilizado o modelo de mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos, desenvolvido por Vanderhoof *et al.*, 1990 e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina–UFC. Os principais parâmetros estudados foram: análise morfométrica, avaliação da permeabilidade intestinal pelo teste lactulose e manitol, estudo hematológico, bem como, análises das variações de massa corpórea, de ingestões de líquidos e alimentos. Adicionalmente, foram realizadas análises imunohistoquímicas para a detecção de TNF- α na mucosite intestinal em ratos e estudo da deleção do RNAm de TNF- α na mucosite intestinal induzida em camundongos.

1.1. Efeito do metotrexato sobre as mucosas intestinais

A figura 15 mostra que as administrações subcutâneas de metotrexato (MTX) nas doses de 1,5, 2,5 e 3,5 mg/kg, durante três dias consecutivos, em ratos tratados apenas com solução fisiológica a 0,9% (Salina), causaram lesões significativas ($P < 0,05$) nas mucosas intestinais, quando comparadas aos animais normais, considerados como controle. Observou-se que, embora todas as doses tenham produzido danos consistentes nas mucosas intestinais, dentro de 40 horas após a terceira administração do antineoplásico, a dose de 2,5 mg/kg produziu uma mucosite intestinal com importante redução da taxa de mortalidade em relação à maior dose. Isto pode ser observado na figura 16, onde a fotomicrografia A corresponde a uma mucosa intestinal de ratos normais e B, a de animais submetidos a mucosite intestinal por doses de 2,5 mg/kg de metotrexato. Assim, esta dose foi a escolhida para se proceder às induções dessas lesões a serem moduladas farmacologicamente por celecoxib, pentoxifilina e talidomida.

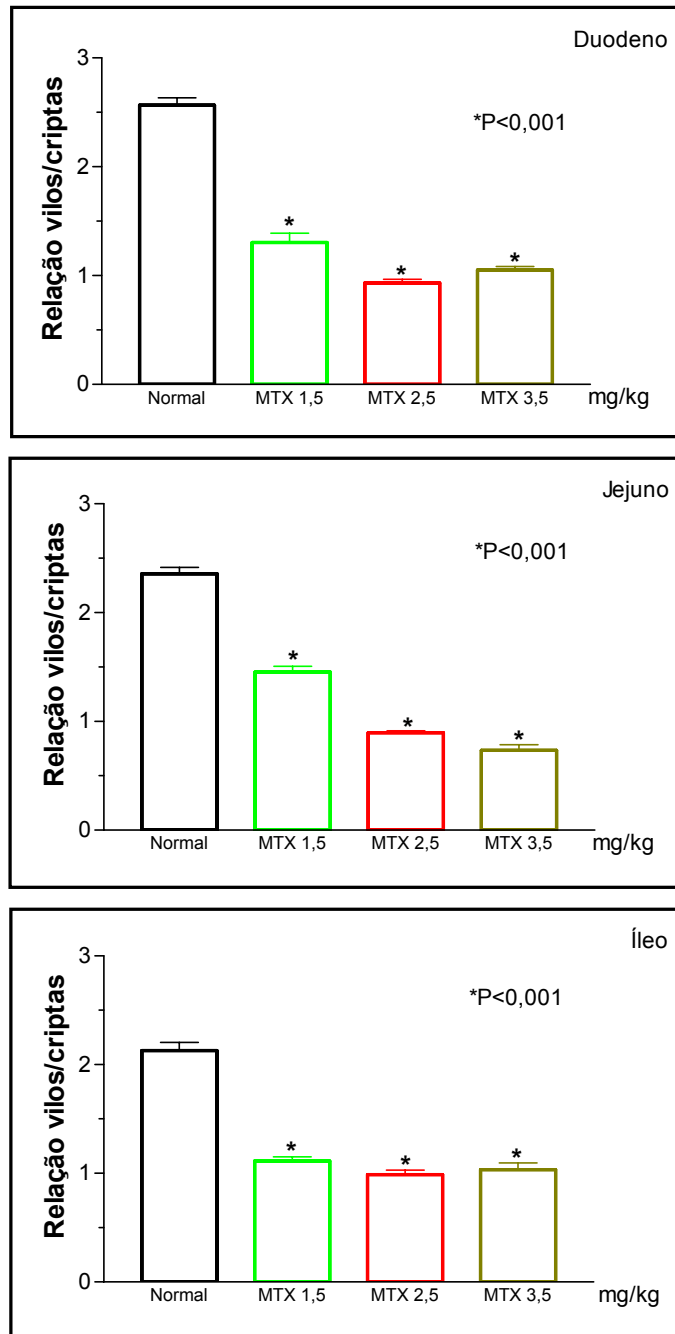


Figura 15: Efeito do metotrexato sobre a morfometria das mucosas intestinais de ratos: Os ratos foram submetidos a mucosite intestinal através de injeções de 1,5; 2,5 e 3,5 mg/kg de metotrexato em três dias consecutivos e no 5º dia foram sacrificados. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e subseqüentemente processados para a técnica de coloração pelo método H&E. *P<0,001 representa diferença estatística dos animais com mucosite em relação aos normais. O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

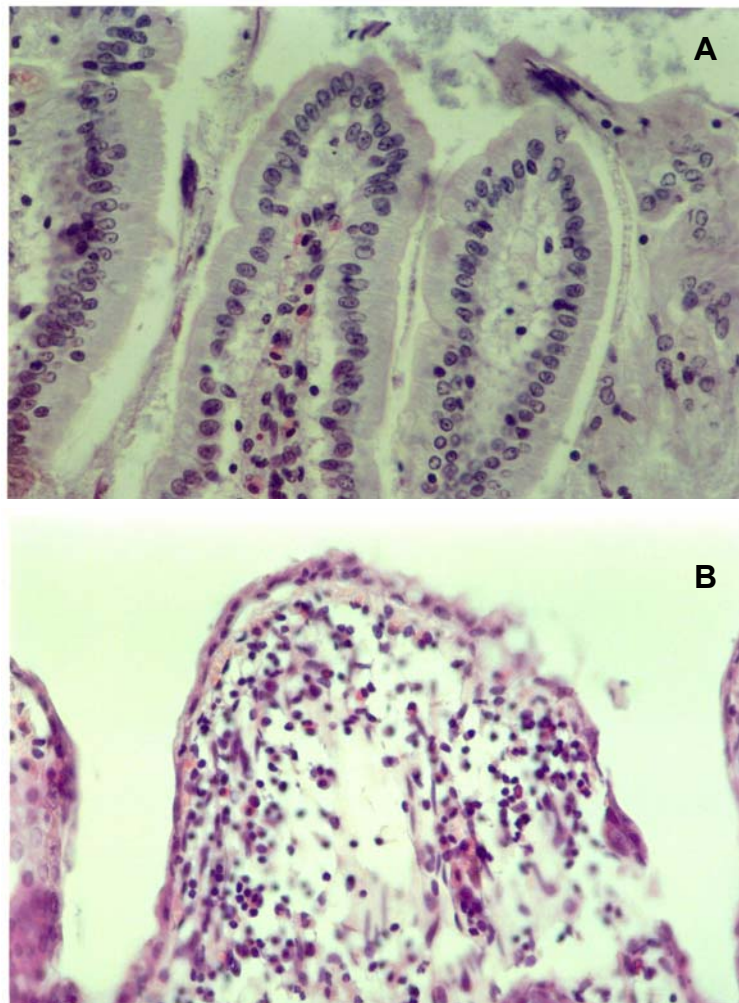


Figura 16: Fotomicrografias das mucosas intestinais de ratos normais (A) e dos apenas submetidos a mucosite intestinal por metotrexato (B): Os ratos foram submetidos a mucosite intestinal através de injeções de 2,5 mg/kg de metotrexato em três dias consecutivos e no 5º dia foram sacrificados. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos, fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 horas e subsequentemente processados para a técnica de coloração pelo método H&E. **(A):** mucosa intestinal de animais normais, não submetidos a mucosite intestinal, mostrando preservação de vilos. **(B):** mucosa intestinal de animais que receberam 0,5 ml de salina uma hora antes de cada injeção de metotrexato, mostrando encurtamento dos vilos (H&E, 400x).

1.2. Efeito do metotrexato sobre a permeabilidade intestinal dos ratos

A figura 17 mostra que as administrações subcutâneas de metotrexato na dose de 2,5 mg/kg, durante três dias consecutivos, causaram alterações significativas sobre as mucosas intestinais analisadas pelo teste da lactulose e manitol, quando comparadas aos ratos normais. Apesar de não ter havido diferença estatística quanto ao percentual de excreção de lactulose entre os grupos, verificou-se redução significativa ($P < 0,001$) do percentual de excreção de manitol. Observou-se, portanto, uma taxa de lactulose/manitol igualmente reduzida ($P < 0,001$).

1.3. Efeito do metotrexato sobre o leucograma dos ratos

A tabela 17 mostra que o metotrexato, na mucosite intestinal em ratos, causou alterações significativas ($P < 0,001$) tanto na contagem total, como na diferencial dos leucócitos sangüíneos ao final dos cinco dias experimentais. Observou-se, então, acentuada leucopenia às custas da redução do número de leucócitos mononucleares ($P < 0,001$) e polimorfonucleares neutrófilos ($P < 0,001$).

1.4. Efeito do metotrexato sobre a variação de massa corpórea dos ratos

Através da figura 18 verifica-se que a mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos foi capaz de causar perda significativa ($P < 0,05$) de massa corpórea a partir do 1º dia, mantendo esse perfil por todo o período experimental de 5 dias, em comparação à variação de massa corpórea dos animais normais ou seja, não submetidos à mucosite intestinal.

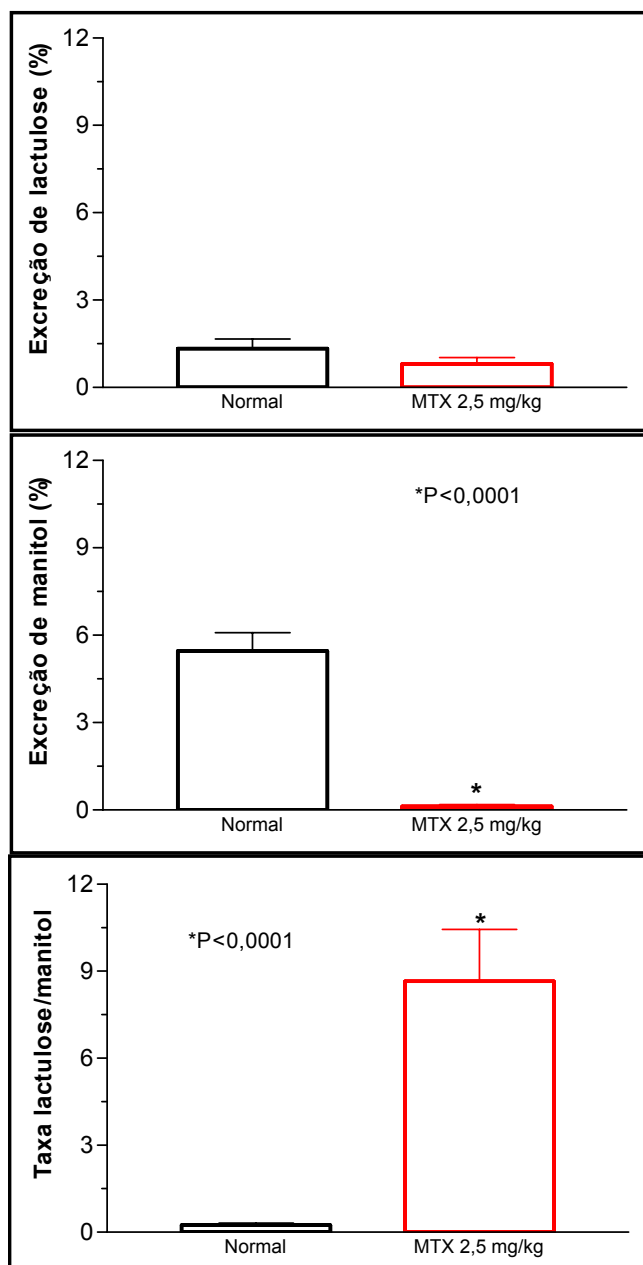


Figura 17: Efeito do metotrexato sobre a permeabilidade intestinal: a mucosite intestinal foi induzida por injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de MTX em ratos, por três dias, e a partir do 4^o dia passaram a receber ração pobre em carboidratos. No dia seguinte, foram coletados e medidos os volumes urinários, e estocados em geladeira para as dosagens posteriores de lactulose e manitol excretadas. *P<0,05 ou *P<0,0001 representa diferença estatística dos animais com mucosite em relação aos normais. O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Teste t).

Tabela 17: Efeito do metotrexato sobre o leucograma dos ratos

	Normal	MTX 2,5 mg/kg
Leucócitos totais	12,0±0,7	1,4±0,2*
Neutrófilos	2,8±0,1	0,1±0,0*
Mononucleares	9,1±0,7	1,3±0,2*

A mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam 0,5 ml de solução salina uma hora antes de cada injeção do quimioterápico. As amostras de sangue foram colhidas das caudas dos animais normais ou dos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato no momento do sacrifício dos mesmos, no quinto dia. Os valores expressam Média ± EPM do número total de leucócitos, neutrófilos e mononucleares x 10³/mm³. *P<0,001 representa diferenças estatísticas entres os valores dos animais normais e os submetidos à mucosite intestinal por metotrexato. O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco em cada grupo (Teste t).

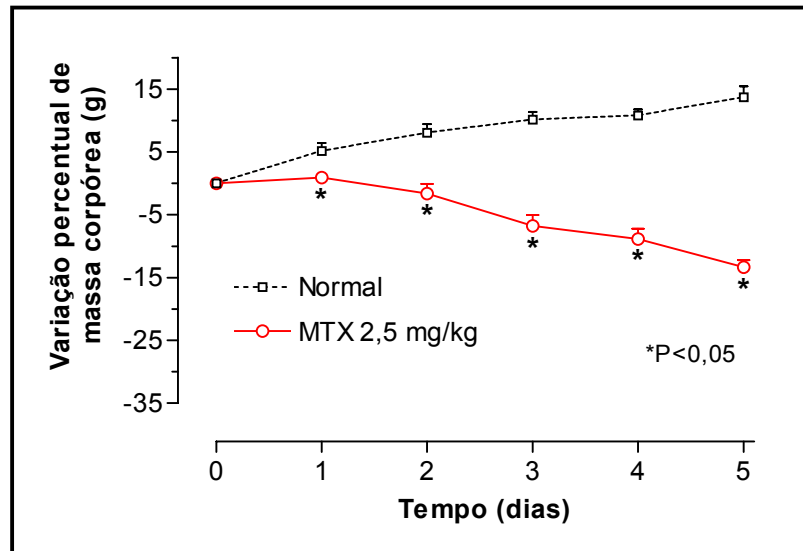


Figura 18: Efeito do metotrexato sobre a variação de massa corpórea dos ratos: a mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam 0,5 ml de solução salina uma hora antes de cada injeção do quimioterápico. As massas corpóreas dos ratos foram medidas diariamente até o 5º dia. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de massa corpórea (g), calculada através das diferenças das massas dos ratos, durante cinco dias, em relação a suas massas iniciais. * $P < 0,05$ representa diferenças estatísticas dos animais submetidos à mucosite intestinal em relação aos ratos normais, sem mucosite (controle ou normal). Em cada experimento, o número de animais utilizados, foi igual a seis (Teste t).

1.5. Efeito do metotrexato sobre a variação de ingestão de líquidos dos ratos

A figura 19 mostra que a mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos foi capaz de causar redução significativa ($P < 0,05$) de ingestão de líquidos a partir do 1º dia, mantendo esse perfil durante todo o período experimental de 5 dias, em comparação à variação de ingestão de líquidos dos animais normais ou seja, não submetidos à mucosite intestinal.

1.6. Efeito do metotrexato sobre a variação de ingestão de alimentos dos ratos

A figura 20 mostra que a mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos foi capaz de causar redução significativa ($P < 0,05$) de ingestão de alimentos a partir do 3º dia, mantendo esse perfil até o sacrifício, no 5º dia, em comparação à variação de ingestão de alimentos dos animais normais ou seja, não submetidos à mucosite intestinal.

1.7. Efeito do metotrexato sobre a detecção de TNF- α por imunohistoquímica

Na figura 21 observam-se as marcações de TNF- α pelo estudo imunohistoquímico das mucosas intestinais de ratos. A fotomicrografia A mostra o duodeno de um animal normal, onde existe marcação para TNF- α ao nível das células do epitélio de revestimento intestinal. A fotomicrografia B mostra o duodeno de um animal submetido a mucosite intestinal por metotrexato durante cinco dias, onde, além das marcações de TNF- α ao nível do epitélio intestinal, surgem células ao nível de lâmina própria, mostrando, assim, um aumento da expressão TNF- α .

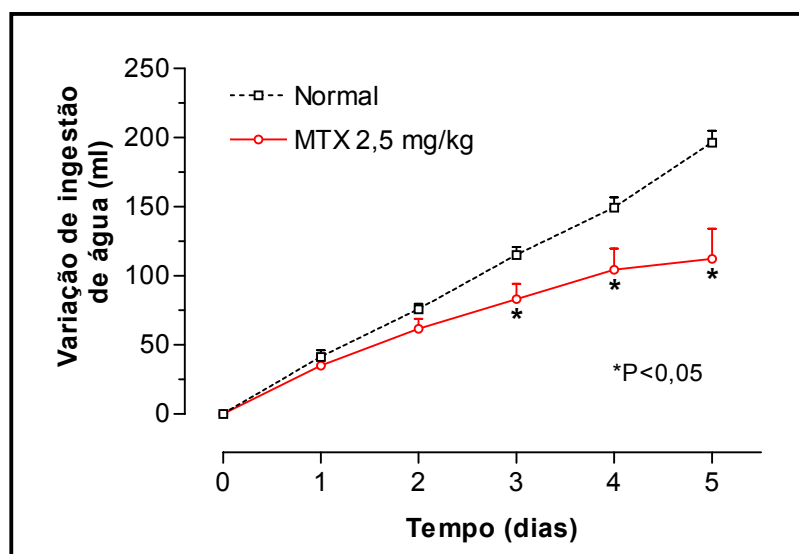


Figura 19: Efeito do metotrexato sobre a variação de ingestão de líquidos dos ratos: a mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam 0,5 ml de solução salina uma hora antes de cada injeção do quimioterápico. As ingestões de líquidos dos ratos foram medidas imediatamente antes da administração do quimioterápico, diariamente, até o 5º dia. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de ingestão de líquidos (ml), calculada através das diferenças das ingestões de líquidos pelos ratos, durante 5 dias, em relação ao volume inicial. *P<0,05 representa diferenças estatísticas dos animais submetidos à mucosite intestinal em relação aos ratos normais, sem mucosite (controle ou normal). Em cada experimento, o número de animais utilizados, foi igual a seis (Teste t).

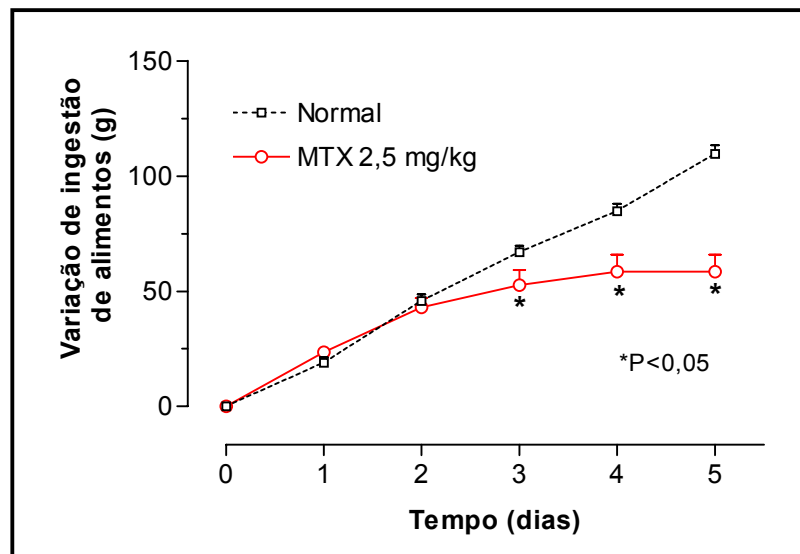


Figura 20 Efeito do metotrexato sobre a variação de ingestão de alimentos dos ratos. A mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam 0,5 ml de solução salina uma hora antes de cada injeção do quimioterápico. As ingestões de alimentos dos ratos foram medidas imediatamente antes da administração do quimioterápico, diariamente, até o 5º dia. Os pontos representam Média \pm EPM da variação de ingestão de alimentos (g), calculada através das diferenças das ingestões de alimentos pelos ratos, durante cinco dias, em relação ao volume inicial. * $P < 0,05$ representa diferenças estatísticas dos animais submetidos a mucosite intestinal em relação aos ratos normais, sem mucosite (controle ou normal). Em cada experimento, o número de animais utilizados, foi igual a seis (Teste t).

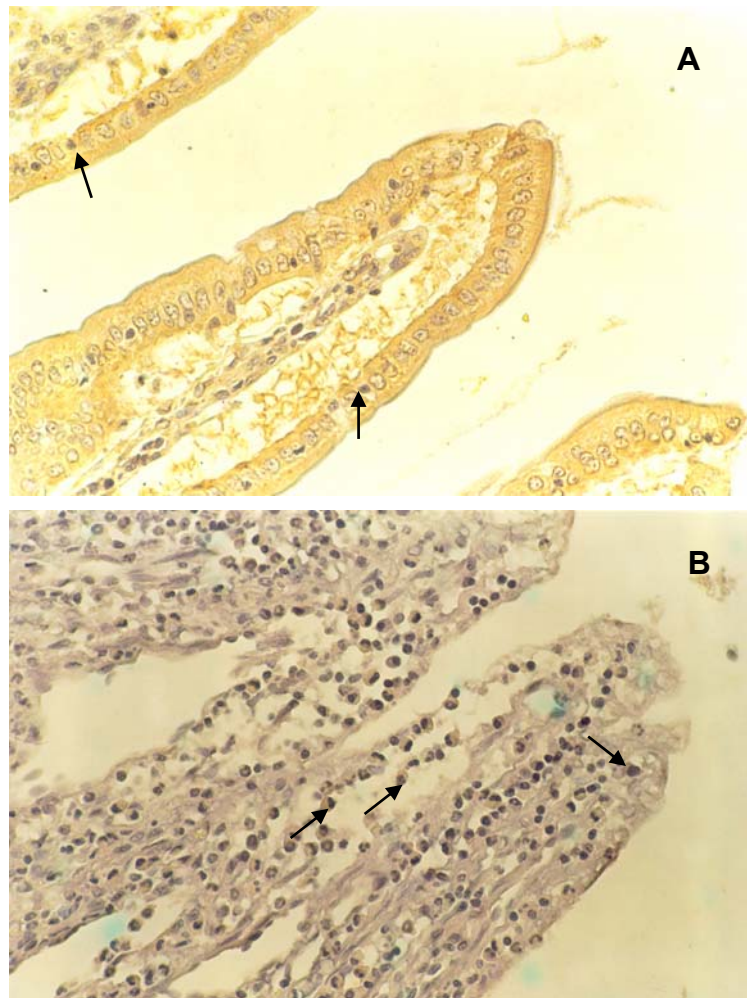


Figura 21: Fotomicrografias das mucosas intestinais de ratos normal (A) e submetido a mucosite intestinal por metotrexato (B) por imunohistoquímica para detecção de TNF- α : os ratos receberam solução salina ou foram submetidos a mucosite intestinal pela administração de metotrexato e, ao final do 5^o dia, foram sacrificados. Foram removidos os segmentos de duodeno, fixados e processados para inclusão em parafina. (A) duodeno de um animal normal, não submetido a mucosite intestinal por metotrexato, mostrando marcação (setas) de TNF- α ao nível de epitélio de revestimento dos vilos. (B) duodeno de um animal submetido a mucosite intestinal por 5 dias, apresentando marcação (setas) de TNF- α ao nível de epitélio de revestimento e, também, na lâmina própria do intestino. (400x).

2. Efeito dos tratamentos farmacológicos nos grupos experimentais

O modelo de mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos, desenvolvido por Vanderhoof *et al.*, 1990 e adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina–UFC, foi utilizado para o estudo dos efeitos dos tratamentos com celecoxib, pentoxifilina e talidomida sobre os parâmetros avaliados no 5º dia experimental: análise morfométrica das mucosas intestinais sob efeito do metotrexato, avaliação da permeabilidade intestinal, estudo hematológico, análises das variações de massa corpórea, de ingestão de líquidos e alimentos dos animais, bem como, imunohistoquímica para detecção de TNF- α .

2.1. Tratamento com celecoxib

2.1.1. Efeito do celecoxib sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal por metotrexato em ratos

A figura 22 mostra o efeito do tratamento com celecoxib (CLX) nas doses de 7,5, 15 e 30 mg/kg ou com solução salina a 0,9%, administradas por via intra-peritoneal, fracionadas a cada 12 horas, diariamente, até o 5º dia experimental. Observou-se que CLX 30 mg/kg foi capaz de reduzir, de forma significativa ($P < 0,01$), as principais alterações vistas na mucosite intestinal experimental por metotrexato, aqui representadas pela relação de encurtamento dos vilos e aumento da profundidade das criptas de segmentos de duodeno, jejuno e íleo, em 37,3%, 42,2% e 29,8%, respectivamente. Na figura 23 observam-se os aspectos histológicos das mucosas intestinais dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. A fotomicrografia C ilustra o efeito protetor do tratamento com CLX na dose de 30 mg/kg, quando comparado à ação do metotrexato (fotomicrografia B) ou ao aspecto de normalidade (fotomicrografia A).

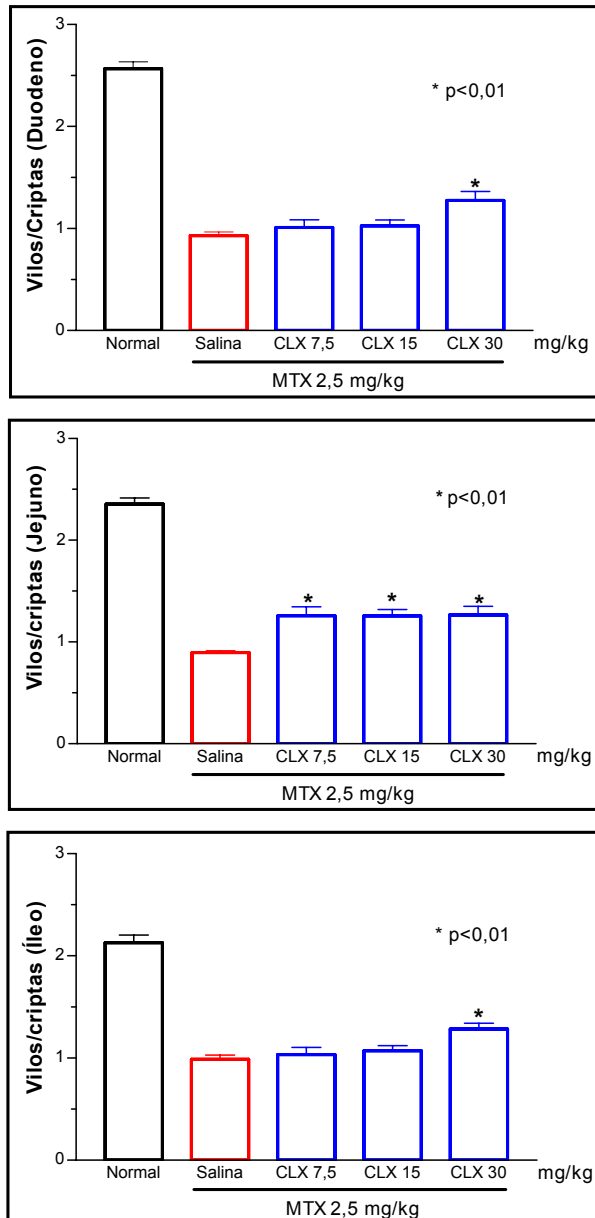


Figura 22: Efeito do celecoxib sobre as alterações morfológicas das mucosas intestinais dos ratos submetidos a mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de metotrexato em ratos. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou CLX 7,5, 15 e 30 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a coloração pelo método H&E. *P<0,001 representa diferença estatística dos animais com mucosite tratados com CLX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

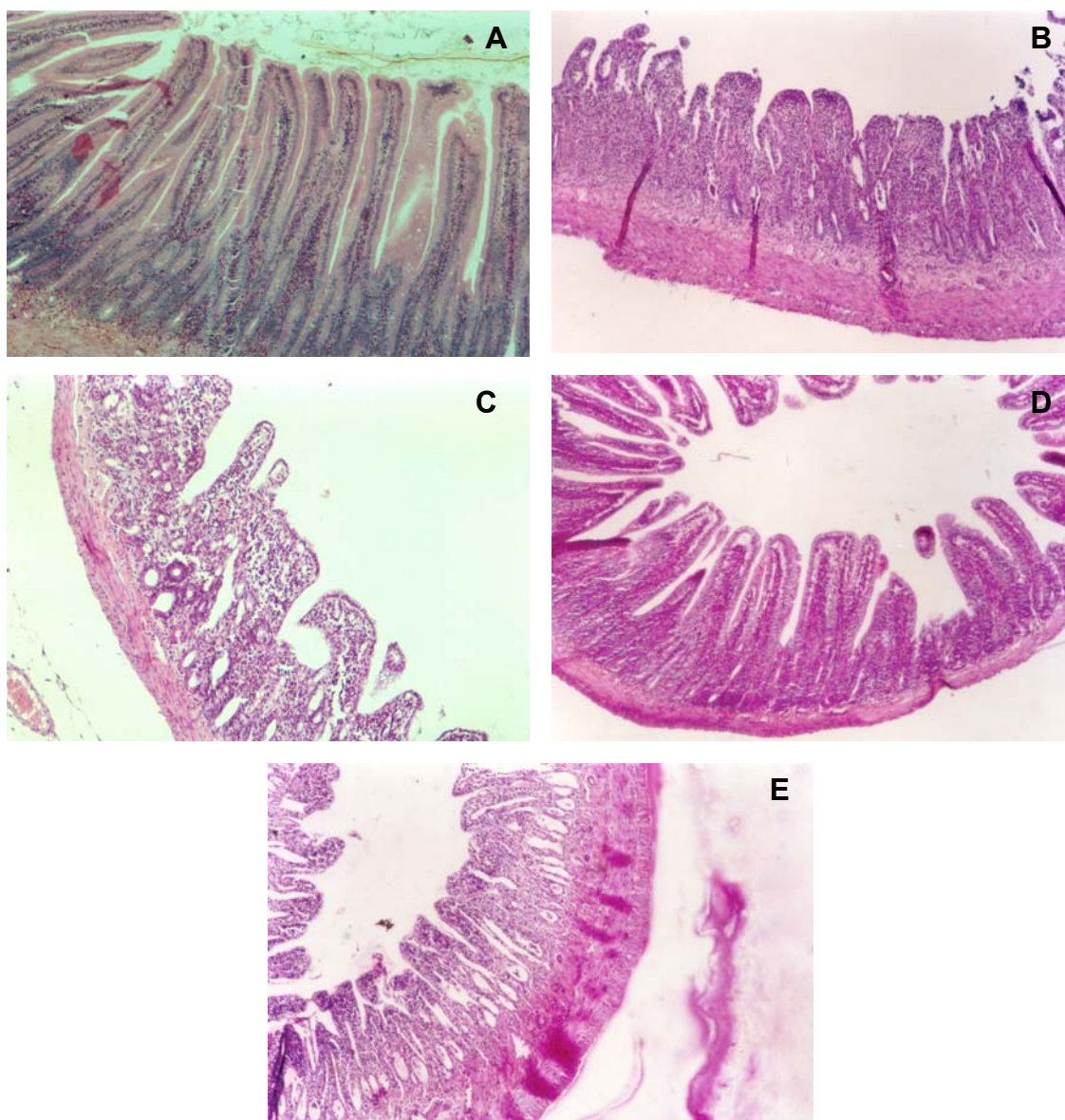


Figura 23: Fotomicrografias das mucosas intestinais de ratos normais (A) ou submetidos a mucosite por metotrexato que receberam solução salina (B), CLX 30 mg/kg (C), PTX 15 mg/kg (D) ou TLD 90 mg/kg (E): Os ratos foram submetidos a mucosite intestinal através de injeções de 2,5 mg/kg de metotrexato. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos, fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%, durante 24 horas e subsequentemente processados para a técnica de coloração pelo método H&E. Os animais receberam CLX, PTX ou TLD - 30, 15 ou 90 mg/kg, respectivamente, 1 e 12 horas antes de cada injeção de metotrexato, diariamente, durante 5 dias, quando então, foram sacrificados (100x).

2.1.2. Efeito do celecoxib sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal

Através da figura 24 observa-se que o tratamento com CLX, na dose de 30 mg/kg, durante cinco dias, apesar de não ter prevenido danos às zonas de oclusão, dada a absorção de lactulose aumentada, foi capaz, contudo, de prevenir, de forma significativa ($P < 0,0001$), a perda de área absorptiva do epitélio intestinal, decorrente da maior excreção de manitol, em animais submetidos a mucosite intestinal por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de metotrexato. Por fim, observou-se redução significativa ($P < 0,0001$) da lesão intestinal induzida pelo metotrexato, aqui representada pela redução da taxa de lactulose/manitol excretados.

2.1.3. Efeito do celecoxib sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal

A tabela 18 mostra que o tratamento com CLX, na dose de 30 mg/kg, durante cinco dias, alterou as contagens do número de leucócitos total e diferencial no sangue periférico dos animais submetidos a mucosite intestinal por três injeções consecutivas de metotrexato. Dessa maneira, CLX reduziu, de forma significativa ($P < 0,001$) a leucopenia, por diminuir a neutropenia e o baixo número de leucócitos mononucleares observados na mucosite intestinal experimental.

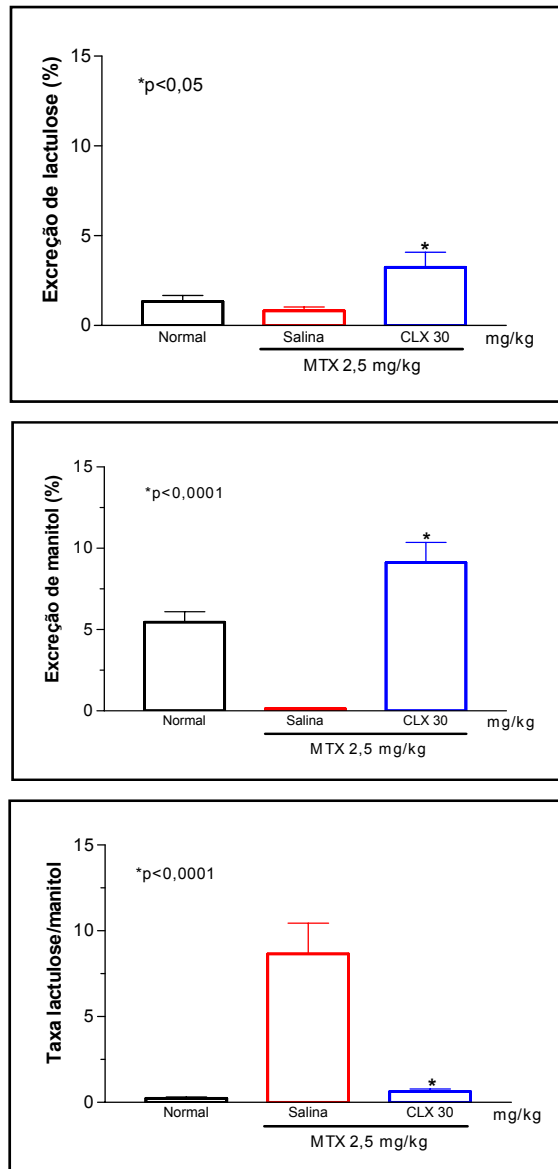


Figura 24: Efeito do celecoxib sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida por injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de MTX em ratos, por três dias, e receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou CLX 7,5, 15 e 30 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. A partir do 4^o dia passaram a receber ração pobre em carboidratos. No 5^o dia foram coletados e medidos os volumes urinários, e estocados em geladeira para as dosagens posteriores de lactulose e manitol excretadas. *P<0,05 ou *P<0,0001 representa diferença estatística dos animais com mucosite tratados com CLX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

Tabela 18: Efeito do celecoxib sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal

	Normal	MTX 2,5 mg/kg	
		Salina	CLX 30 mg/kg
Leucócitos totais	12,0±0,7	1,4±0,2	7,4±1,0*
Neutrófilos	2,8±0,1	0,1±0,0	1,5±0,2*
Mononucleares	9,1±0,7	1,3±0,2	5,9±0,8*

A mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou CLX 30 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. As amostras de sangue foram colhidas das caudas dos animais normais ou dos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato no momento do sacrifício dos mesmos, no quinto dia. Os valores expressam Média ± EPM do número total de leucócitos, neutrófilos e mononucleares x 10³/mm³. *P<0,001 representa diferenças estatísticas entres os valores dos animais com mucosite tratados com CLX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

2.1.4. Efeito do celecoxib sobre os aspectos metabólicos dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato

A figura 25 mostra os aspectos metabólicos dos animais, tais como variação de massa corpórea (A), variação de ingestão de líquidos (B) e de alimentos (C). Em A observa-se que o tratamento com CLX não reverteu de forma significativa ($P < 0,05$) a perda de massa corpórea induzida pela mucosite intestinal, quando comparada à variação de massa corpórea de animais normais ou seja, sem mucosite. Contudo, observa-se uma tendência a recuperação de suas massas, embora sem haver diferença estatisticamente significativa, quando relacionadas às massas dos animais submetidos a mucosite oral experimental não-tratada (Salina). Da mesma maneira, verifica-se que o tratamento com CLX não reverteu de forma significativa ($P < 0,05$) a menor ingestão de líquidos (B) nem de alimentos (C) observada em animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato, quando comparada à variação de consumo de água de ratos normais ou seja, sem mucosite experimental.

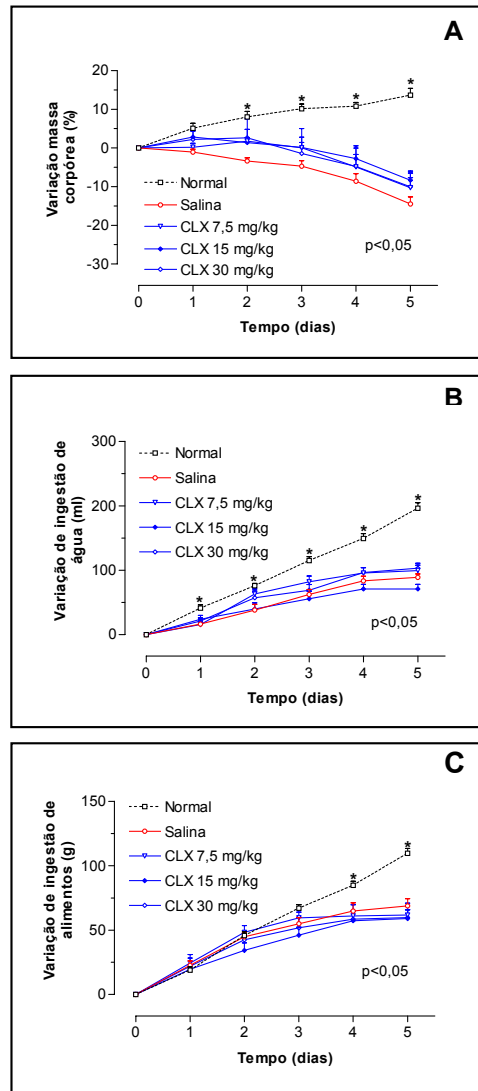


Figura 25: Efeito do celecoxib sobre as variações de massa corpórea (A), de ingestão de líquidos (B) e alimentos (C) dos ratos com mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou CLX 7,5, 15 e 30 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. As medidas das variações foram feitas, diariamente, até o 5^o dia. Os pontos representam Média \pm EPM das variações calculadas através das diferenças dos valores obtidos durante cinco dias, em relação a suas massas iniciais. *P<0,05 diferença estatística dos animais com mucosite tratados com CLX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

2.2. Grupo tratado com pentoxifilina

2.2.1. Efeito da pentoxifilina sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal dos ratos

A figura 26 mostra o efeito do tratamento com pentoxifilina (PTX) nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg ou com solução salina a 0,9%, administradas por via intra-peritoneal, fracionadas a cada 12 horas, diariamente, até o 5º dia experimental. Observou-se que a PTX, principalmente na dose de 15 mg/kg, foi capaz de inibir, de forma significativa ($P < 0,01$), as principais alterações vistas na mucosite intestinal experimental, aqui representadas pelo encurtamento dos vilos e aumento da profundidade das criptas de segmentos de duodeno, jejuno e íleo, em 38,1%, 36,8% e 30,7%, respectivamente. Na figura 22 observam-se os aspectos histológicos das mucosas intestinais dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. A fotomicrografia D ilustra o efeito protetor do tratamento com PTX na dose de 15 mg/kg, quando comparado à ação do metotrexato (fotomicrografia B) ou ao aspecto de normalidade (fotomicrografia A).

2.2.2. Efeito da pentoxifilina sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal

Através da figura 27 verifica-se que o tratamento com PTX, na dose de 30 mg/kg, durante cinco dias, foi capaz de prevenir, de forma significativa ($P < 0,0001$), a perda de área absorptiva do epitélio intestinal, dada a maior excreção de manitol, em animais submetidos a mucosite intestinal por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de metotrexato. Adicionalmente, observou-se redução significativa ($P < 0,0001$) da lesão intestinal induzida pelo metotrexato, aqui representada pela redução da taxa de lactulose/manitol excretados.

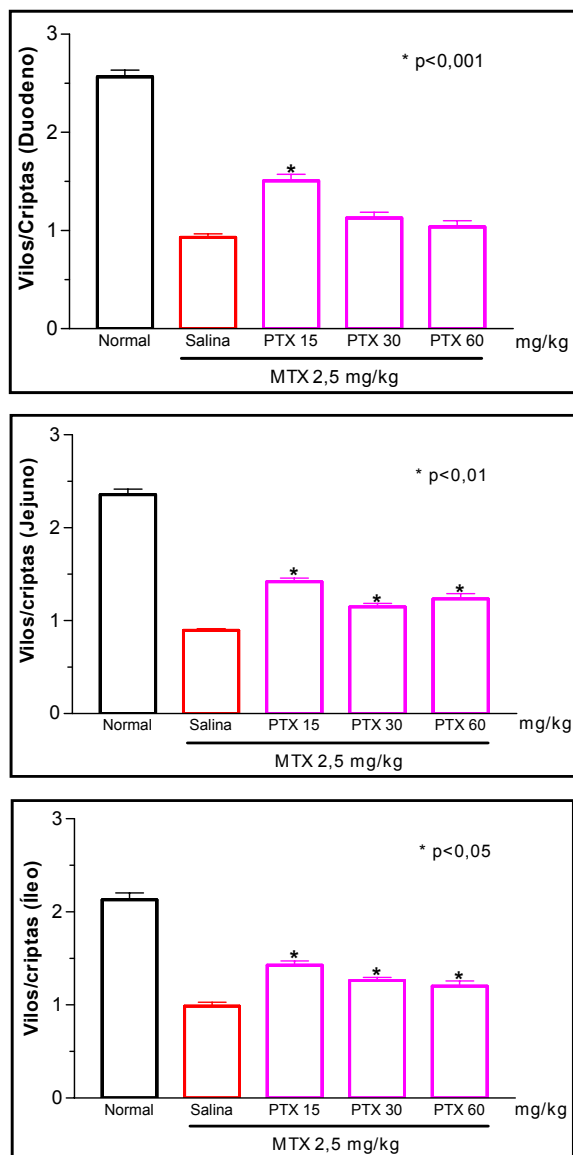


Figura 26: Efeito da pentoxifilina sobre as alterações morfológicas das mucosas intestinais dos ratos submetidos a mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de metotrexato em ratos. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou PTX 15, 30 e 60 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a coloração pelo método H&E. *P<0,001 representa diferença estatística dos animais com mucosite tratados com PTX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

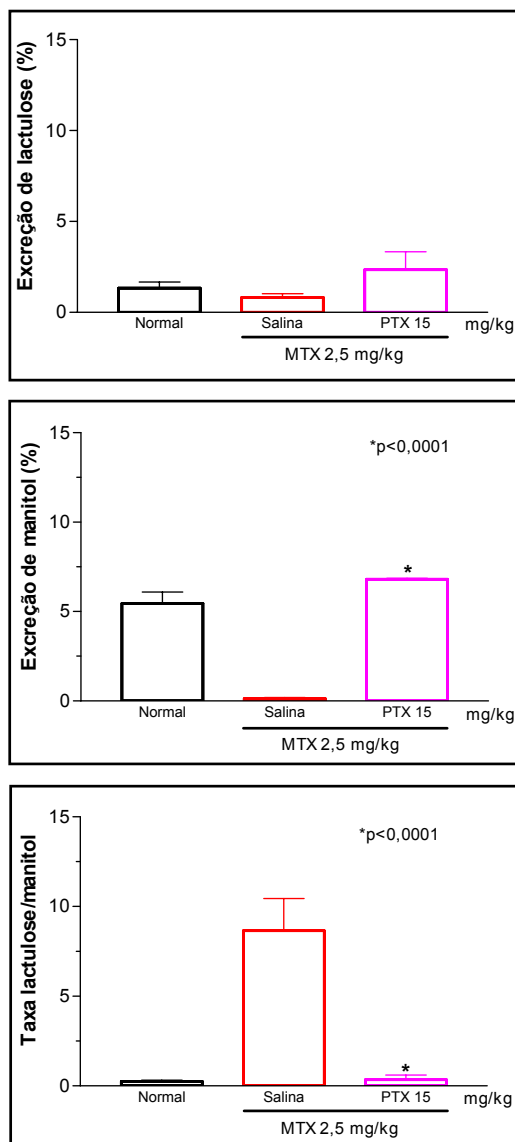


Figura 27: Efeito da pentoxifilina sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida por injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de MTX em ratos, por três dias, e receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou PTX 15 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. A partir do 4^o dia passaram a receber ração pobre em carboidratos. No 5^o dia foram coletados e medidos os volumes urinários, e estocados em geladeira para as dosagens posteriores de lactulose e manitol excretadas. *P<0,05 ou *P<0,0001 representa diferença estatística dos animais com mucosite tratados com PTX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

2.2.3. Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal

A tabela 19 mostra que o tratamento com PTX, na dose de 15 mg/kg, durante cinco dias, não foi capaz de alterar as contagens do número de leucócitos total e diferencial no sangue periférico dos animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. Portanto, a PTX não reduziu, de forma significativa ($P < 0,001$) a leucopenia, a neutropenia, nem a linfomonocitopenia observadas na mucosite intestinal experimental.

2.2.4. Efeito da pentoxifilina sobre os aspectos metabólicos dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato

A figura 28 mostra os aspectos metabólicos dos animais, tais como variação de massa corpórea (A), variação de ingestão de líquidos (B) e de alimentos (C). Em A observa-se que o tratamento com PTX, em todas as doses, reverteu, de forma significativa ($P < 0,05$), a perda de massa corpórea induzida pela mucosite intestinal, quando comparada à variação de massa corpórea de animais com mucosite intestinal (Salina). Contudo, não se observou a recuperação de suas massas, quando comparadas às dos animais normais, isto é, não submetidos a mucosite intestinal. Contudo, verifica-se que o tratamento com PTX não reverteu de forma significativa ($P < 0,05$) a menor ingestão de líquidos (B) nem de alimentos (C) observada em animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato, quando comparada à variação de consumo de água de ratos normais ou seja, sem mucosite experimental.

Tabela 19: Efeito da pentoxifilina sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal

	Normal	MTX 2,5 mg/kg	
		Salina	PTX 15 mg/kg
Leucócitos totais	12,0±0,7	1,4±0,2	3,6±1,7
Neutrófilos	2,8±0,1	0,1±0,0	0,6±0,3
Mononucleares	9,1±0,7	1,3±0,2	3,0±1,4

A mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou PTX 15 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. As amostras de sangue foram colhidas das caudas dos animais normais ou dos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato no momento do sacrifício dos mesmos, no quinto dia. Os valores expressam Média ± EPM do número total de leucócitos, neutrófilos e mononucleares x 10³/mm³. *P<0,001 representa diferenças estatísticas entres os valores dos animais com mucosite tratados com PTX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

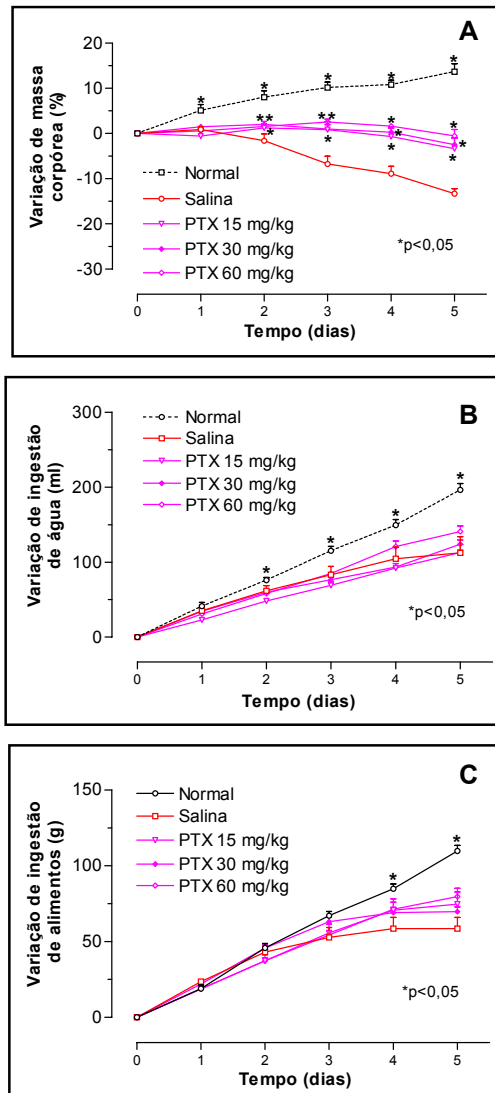


Figura 28: Efeito da pentoxifilina sobre as variações de massa corpórea (A), de ingestão de líquidos (B) e alimentos (C) dos ratos com mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou PTX 15, 30 e 60 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. As medidas das variações foram feitas, diariamente, até o 5^o dia. Os pontos representam Média \pm EPM das variações calculadas através das diferenças dos valores obtidos durante cinco dias, em relação a suas massas iniciais. *P<0,05 diferença estatística dos animais com mucosite tratados com PTX em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

2.3. Grupo tratado com talidomida

2.3.1. Efeito da talidomida sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal dos ratos

A figura 29 mostra o efeito do tratamento com talidomida (TLD) nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg ou com solução salina a 0,9%, administradas por via intra-peritoneal, fracionadas a cada 12 horas, diariamente, até o 5º dia experimental. Observou-se que a TLD, nas maiores doses, foi capaz de inibir, de forma significativa ($P < 0,05$), as principais alterações vistas na mucosite intestinal experimental, aqui representadas pelo encurtamento dos vilos e aumento da profundidade das criptas de segmentos de duodeno e jejuno, respectivamente, em 37,0% e 26,0 % (TLD 30 mg/kg) e 28,9% e 22,1 % (TLD 90 mg/kg). Na figura 23 observam-se os aspectos histológicos das mucosas intestinais dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. A fotomicrografia E ilustra o efeito protetor do tratamento com TLD na dose de 90 mg/kg, quando comparado à ação do metotrexato (fotomicrografia B) ou ao aspecto de normalidade (fotomicrografia A).

2.3.2. Efeito da talidomida sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal

Através da figura 30 observa-se que o tratamento com TLD, na dose de 90 mg/kg, durante cinco dias, foi capaz de prevenir, de forma significativa ($P < 0,0001$), a perda de área absorptiva do epitélio intestinal, dada a maior excreção de manitol, em animais submetidos a mucosite intestinal por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de metotrexato. Adicionalmente, observou-se redução significativa ($P < 0,0001$) da lesão intestinal induzida pelo metotrexato, aqui representada pela redução da taxa de lactulose/manitol excretados.

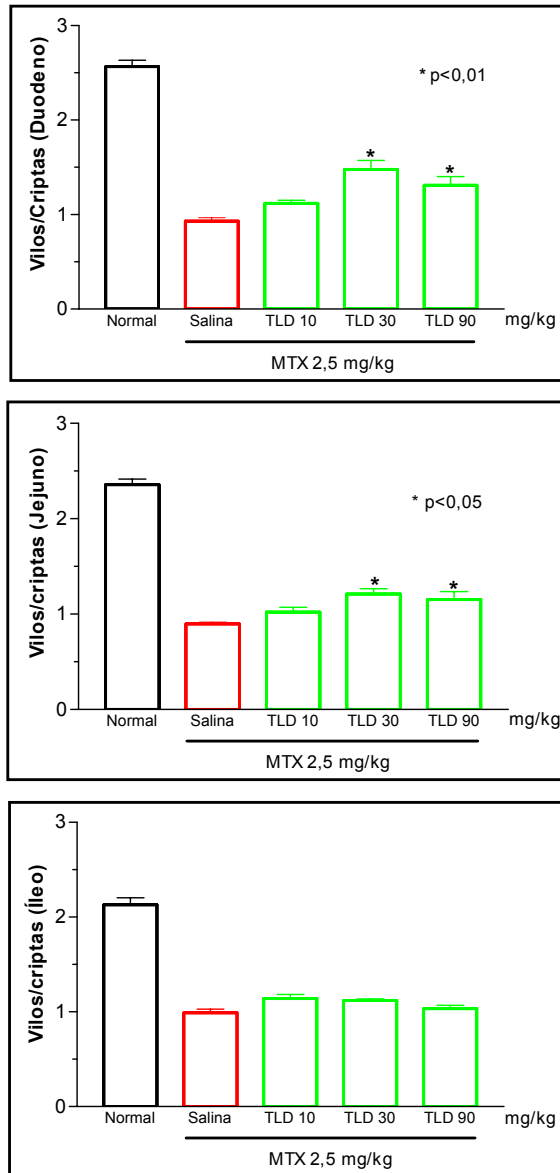


Figura 29: Efeito da talidomida sobre as alterações morfológicas das mucosas intestinais dos ratos submetidos a mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida por três injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de metotrexato em ratos. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou TLD 10, 30 e 90 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5º dia. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a coloração pelo método H&E. *P<0,001 representa diferença estatística dos animais com mucosite tratados com TLD em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

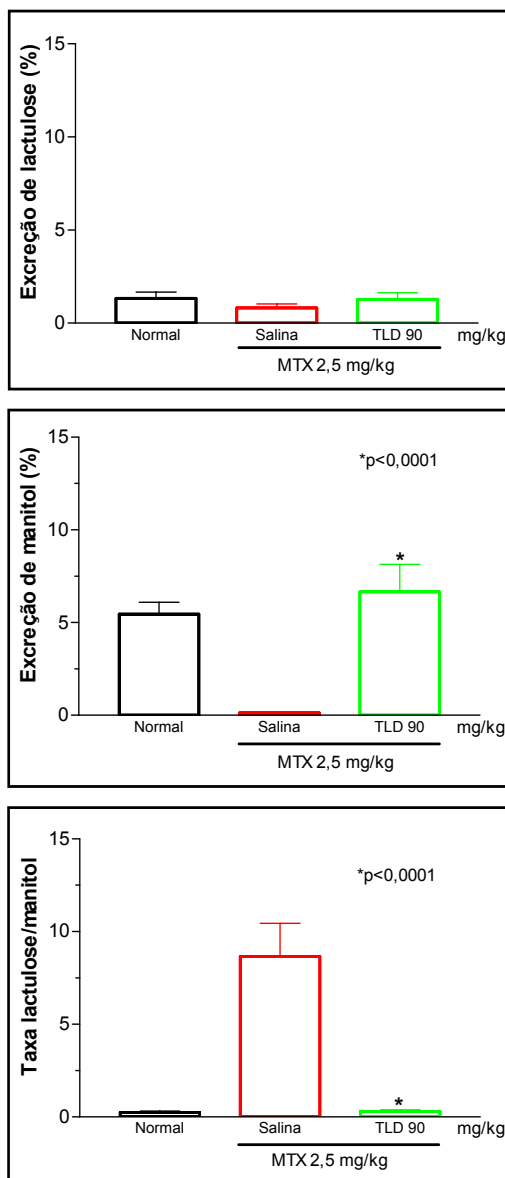


Figura 30: Efeito da talidomida sobre a permeabilidade intestinal dos ratos com mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida por injeções consecutivas de 2,5 mg/kg de MTX em ratos, por três dias, e receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou TLD 90 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. A partir do 4^o dia passaram a receber ração pobre em carboidratos. No 5^o dia foram coletados e medidos os volumes urinários, e estocados em geladeira para as dosagens posteriores de lactulose e manitol excretadas. *P<0,05 ou *P<0,0001 representa diferença estatística dos animais com mucosite tratados com TLD em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

2.3.3. Efeito da talidomida sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal

A tabela 20 mostra que o tratamento com TLD, na dose de 90 mg/kg, durante cinco dias, não foi capaz de alterar as contagens do número de leucócitos total e diferencial no sangue periférico dos animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. Portanto, a TLD não reduziu, de forma significativa ($P < 0,001$) a leucopenia, a neutropenia, nem a linfomonocitopenia observadas na mucosite intestinal experimental.

2.3.4. Efeito da talidomida sobre os aspectos metabólicos dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato

A figura 31 mostra os aspectos metabólicos dos animais, tais como variação de massa corpórea (A), variação de ingestão de líquidos (B) e de alimentos (C). Em A observa-se que o tratamento com TLD, em nenhuma das doses utilizadas, foi capaz de reverter, de forma significativa ($P < 0,05$), a perda de massa corpórea induzida pela mucosite intestinal, quando comparada à variação de massa corpórea de animais normais ou seja, sem mucosite intestinal induzida por metotrexato. Da mesma maneira, verifica-se que o tratamento com TLD não reverteu de forma significativa ($P < 0,05$) a menor ingestão de líquidos (B) nem de alimentos (C) observada em animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato, quando comparada à variação de consumo de água de ratos normais ou seja, sem mucosite experimental.

Tabela 20: Efeito da talidomida sobre o leucograma dos ratos com mucosite intestinal

	Normal	MTX 2,5 mg/kg	
		Salina	TLD 90 mg/kg
Leucócitos totais	12,0±0,7	1,4±0,2	2,5±0,6
Neutrófilos	2,8±0,1	0,1±0,0	0,6±0,1
Mononucleares	9,1±0,7	1,3±0,2	1,9±0,5

A mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou TLD 90 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5º dia. As amostras de sangue foram colhidas das caudas dos animais normais ou dos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato no momento do sacrifício dos mesmos, no quinto dia. Os valores expressam Média ± EPM do número total de leucócitos, neutrófilos e mononucleares x 10³/mm³. *P<0,001 representa diferenças estatísticas entres os valores dos animais com mucosite tratados com TLD em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

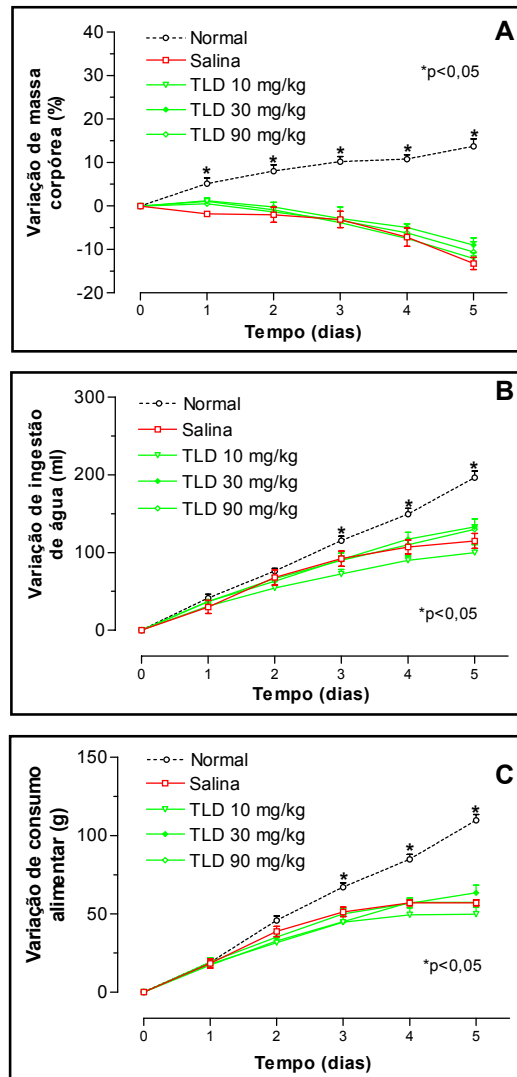


Figura 31: Efeito da talidomida sobre as variações de massa corpórea (A), de ingestão de líquidos (B) e alimentos (C) dos ratos com mucosite intestinal: a mucosite intestinal foi induzida em ratos através de três injeções consecutivas de metotrexato. Os animais receberam, 1 e 12 horas antes de cada administração do quimioterápico, solução salina ou TLD 10, 30 e 90 mg/kg, diariamente, até o sacrifício, no 5^o dia. As medidas das variações foram feitas, diariamente, até o 5^o dia. Os pontos representam Média \pm EPM das variações calculadas através das diferenças dos valores obtidos durante cinco dias, em relação a suas massas iniciais. *P<0,05 diferença estatística dos animais com mucosite tratados com TLD em relação aos não tratados (Salina). O número de ratos utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

2.3.5. Imunohistoquímica para detecção de TNF- α em ratos com mucosite intestinal induzida por metotrexato e tratados com talidomida

Na figura 32 observa-se o efeito da TLD, na dose de 90 mg/kg, na marcação de TNF- α , por imunohistoquímica, das mucosas intestinais de ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. A fotomicrografia C mostra a redução evidente da marcação de TNF- α tanto ao nível de epitélio de revestimento intestinal, como também, da lâmina própria, quando comparada à fotomicrografia B, a qual evidencia o duodeno de um animal submetido a mucosite intestinal por metotrexato durante cinco dias. Observam-se marcações de TNF- α ao nível do epitélio intestinal e células ao nível de lâmina própria, ou à fotomicrografia A, na qual o duodeno de um animal normal evidencia marcação para TNF- α apenas ao nível das células do epitélio de revestimento intestinal, mostrando, assim, uma redução de TNF- α na mucosa submetida a mucosite intestinal por metotrexato.

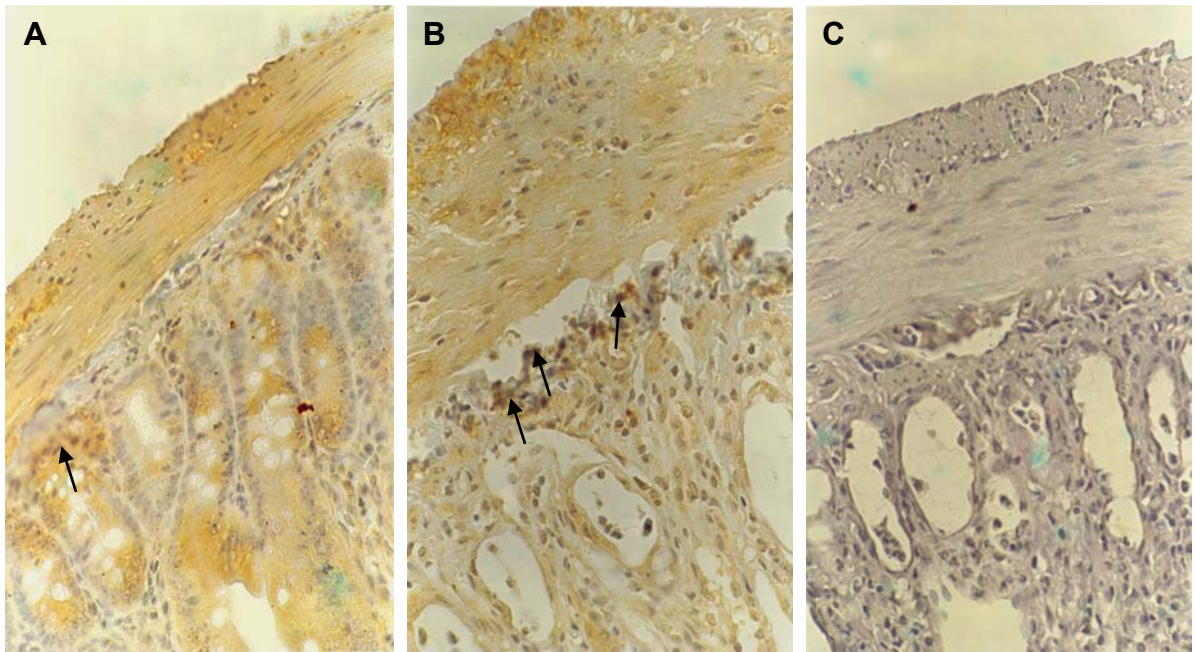


Figura 32: Fotomicrografias das mucosas intestinais de ratos normal (A), submetido a mucosite intestinal por metotrexato recebendo salina (B) ou TLD 90 mg/kg (C), por técnica de imunohistoquímica para detecção de TNF- α : os ratos receberam solução salina ou foram submetidos a mucosite intestinal pela administração de metotrexato e, ao final do 5^o dia, foram sacrificados, tiveram os seus segmentos de duodeno retirados, fixados e processados para inclusão em parafina. (A) duodeno de um animal normal, não submetido a mucosite intestinal por metotrexato, mostrando marcação de TNF- α ao nível de epitélio de revestimento dos vilos. (B) duodeno de um animal submetido a mucosite intestinal por 5 dias, apresentando marcação de TNF- α ao nível de epitélio de revestimento e, também, na lâmina própria do intestino. (C) duodeno de um animal submetido a mucosite intestinal por 5 dias, tratado com TLD 90 mg/kg, apresentando redução evidente na marcação de TNF- α ao nível de epitélio de revestimento e, também, na lâmina própria do intestino. Aumento de 400x.

3. Mucosite intestinal induzida em camundongos

Foi utilizado o modelo de mucosite intestinal induzida por metotrexato, baseado no modelo desenvolvido por Vanderhoof *et al.*, 1990 e adaptado para camundongos C57BL/6 no Laboratório de Farmacologia da Inflamação do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Foram feitas análises morfométricas das mucosas intestinais de camundongos C57BL/6 normais (TNF-R1+/+) e de C57BL/6 *Knockout* para o receptor R1 (p55) de TNF- α (TNF-R1-/-).

3.1. Efeito do metotrexato sobre as alterações histopatológicas das mucosas intestinais dos camundongos

A figura 33 demonstra que as administrações subcutâneas de metotrexato (MTX) nas doses de 1,25, 2,0 e 2,5 mg/kg, durante três dias consecutivos, em camundongos C57BL/6 (TNF-R1+/+), causaram diminuição significativa e dose dependente da relação vilos/criptas nos três segmentos intestinais, duodeno, jejuno e íleo ($P < 0,05$), quando comparadas aos animais normais, considerados como controle. Observaram-se que, embora ambas as doses de 2,0 e 2,5 mg/kg tenham causado mucosites intestinais dentro de 40 horas desde a terceira administração do antineoplásico, a dose de 2,5 mg/kg produziu danos mais consistentes na mucosa intestinal, sem alteração significativa da mortalidade dos animais. Assim, esta dose foi a escolhida para se proceder às induções dessas lesões em camundongos C57BL/6 *Knockout* para o receptor R1 de TNF- α (TNF-R1-/-).

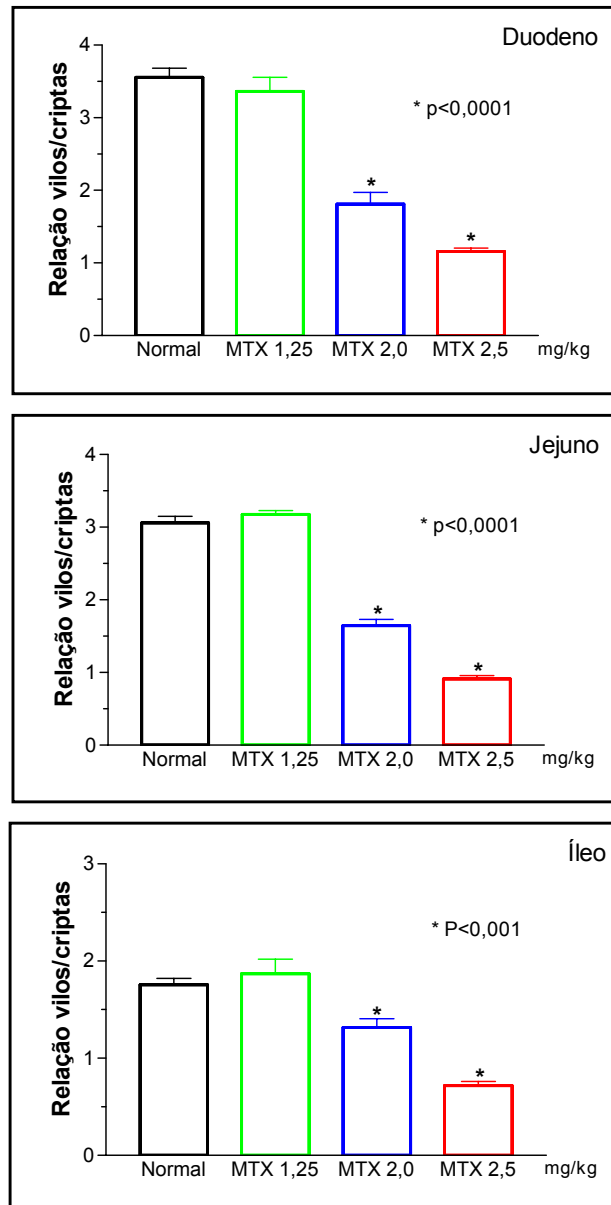


Figura 33: Efeito do metotrexato sobre as alterações histopatológicas das mucosas intestinais dos camundongos: Os camundongos C57BL/6 TNF-R1+/+ (normais) foram submetidos a mucosite intestinal através de injeções de 1,25, 2,0 e 2,5 mg/kg de metotrexato em três dias consecutivos e no 5º dia foram sacrificados. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e subseqüentemente processados para a técnica de coloração pelo método H&E. *P<0,001 representa diferença estatística dos animais com mucosite em relação aos C57BL/6 normais. O número de animais utilizados foi, no mínimo, cinco (Anova; Bonferroni).

3.2. Efeito da deficiência do gene de TNF- α sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal dos camundongos

A figura 34 mostra o efeito da deficiência do gene de TNF- α (TNF-R1 -/-) em camundongos submetidos ou não a mucosite intestinal por metotrexato. Observou-se que o procedimento *Knockout* por si só, causou redução significativa da relação vilos/criptas ao nível de duodeno e jejuno, sugerindo que o TNF- α possui um papel importante na manutenção dos processos homeostáticos, especialmente nos segmentos proximais da mucosa intestinal. Quando a mucosite intestinal foi induzida por metotrexato em animais *Knockout* para TNF- α (TNF-R1-/-), observaram-se menores alterações morfométricas (23,6% e 25,4% de redução em relação aos animais *Knockout* TNF-R1 -/- que não receberam metotrexato; P<0,01) ao nível de jejuno e íleo, respectivamente. Estas percentagens foram significativamente menores do que as detectadas nos animais não *Knockout* para TNF- α , TNF-R1+/+ (70% e 59% de redução em relação aos animais normais, TNF-R1+/+, que não receberam metotrexato; P<0,01) ao nível de jejuno e íleo, respectivamente. Entretanto, ao nível de duodeno, as alterações na relação vilos/criptas dos animais *knockout* (TNF-R1-/-) submetidos a mucosite por metotrexato não foram diferentes das observadas em animais submetidos igualmente a mucosite intestinal, porém, normais (TNF-R1+/+). Isto indica que o TNF- α , induzido em processos inflamatórios, é responsável pela amplificação das lesões induzidas por metotrexato.

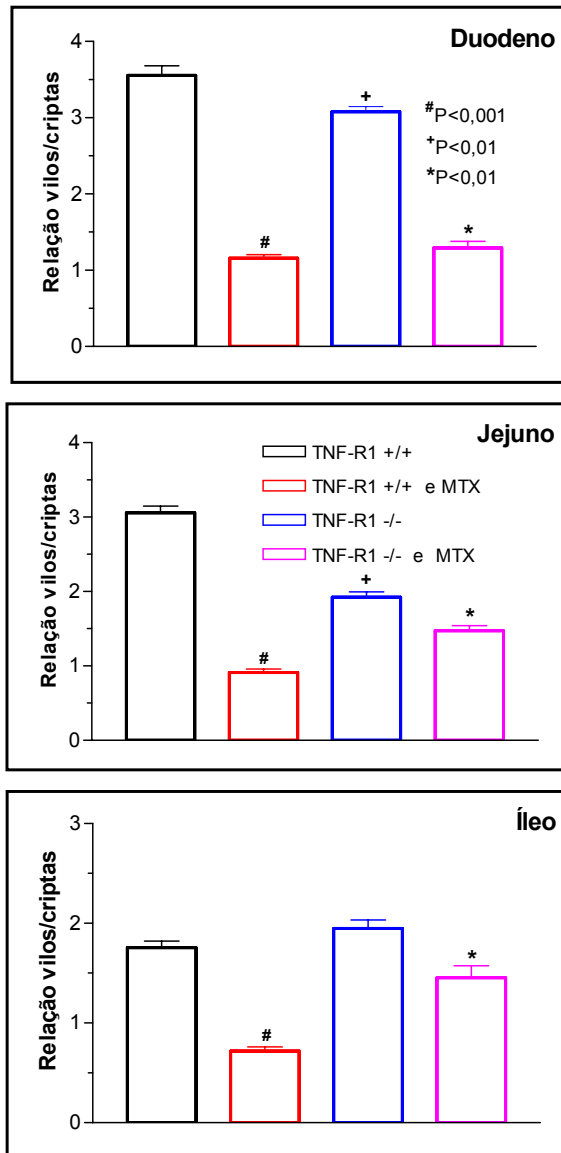


Figura 34: Efeito da deficiência do gene para TNF- α sobre os aspectos morfométricos observados na mucosite intestinal dos camundongos: Camundongos C57BL/6 (TNF-R1+/+ e MTX ou TNF-R1-/- e MTX) foram submetidos a mucosite intestinal por metotrexato durante três dias consecutivos e sacrificados no 5º dia. Segmentos de duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para H&E. #P<0,001 representa diferenças estatísticas entres os valores dos camundongos TNF-R1+/+ e os submetidos a mucosite intestinal (TNF-R1+/+ e MTX), +P<0,01 entre os animais TNF-R1-/- e os TNF-R1+/+, e *P<0,01, entre os TNF-R1-/- e TNF-R1-/- e MTX. O número de animais utilizados foi, no mínimo, quatro em cada grupo (Anova, Bonferroni).

V. DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

O estudo das mucosites tem sido o interesse de cientistas por mais de vinte anos. Infelizmente, isto não tem resultado no desenvolvimento de procedimentos padronizados para a prevenção e manejo dessas lesões (Herrstedt 2000).

Devido às dificuldades encontradas na tentativa de determinar os diversos mediadores envolvidos nas mucosites em pacientes, têm-se desenvolvido modelos experimentais com o intuito de investigar os mecanismos relacionados e avaliar os efeitos de diferentes agentes terapêuticos (Sonis *et al.* 1990; Vanderhoof *et al.* 1990).

A análise da mucosite é feita, sobretudo, baseada em dados de observação. Considera-se a hipótese da mesma ser um processo biológico complexo, formado por fases interdependentes e conseqüentes a uma série de ações mediadas por citocinas, por exemplo. Soma-se isto ao efeito direto da droga antineoplásica no epitélio, à flora bacteriana e ao status da medula óssea do paciente. Buscou-se, portanto, nesse trabalho, utilizar ferramentas reconhecidas como inibidoras de diversas ciclooxigenases e citocinas, com o objetivo de estudar os papéis de tais mediadores no surgimento das mucosites causadas pelos quimioterápicos, quiçá no seu curso evolutivo, em modelos animais de mucosites oral e intestinal. Dessa maneira, a mucosite oral foi estabelecida por 5-fluorouracil em hamster, de acordo com os procedimentos de Sonis *et al.* 1990, e a mucosite intestinal foi induzida por metotrexato em ratos, baseada em Vanderhoof *et al.* 1990.

No modelo de mucosite oral, utilizou-se o hamster, dado que essa espécie tem-se mostrado adequada para o estudo por possuir particularidades anatômicas favoráveis, como uma mucosa jugal móvel e crescida, além da importante tolerabilidade às doses de 5-fluorouracil capazes de induzir a mucosite oral, sem mortalidade significativa (Sonis *et*

al. 1990). Estudos anteriores mostraram que o uso de metotrexato falhou em causar mucosite oral em hamsters ou em ratos e que, embora tenha havido alterações histológicas, nenhuma lesão ulcerativa significativa se desenvolveu nesses animais (Shklar 1968; Duperon 1978). O uso de 5-fluorouracil em ratos, também, não foi efetivo na indução da mucosite oral (Shklar 1968; Duperon 1978). Assim, devido à demonstrada sensibilidade dos hamsters às pirimidinas fluorinadas, o 5-fluorouracil foi selecionado para ser usado nesse modelo.

Com o intuito de exacerbar a estomatotoxicidade, foi escolhido um esquema de duas doses diferenciadas de 5-fluorouracil, 60 e 40 mg/kg, associadas ao trauma mecânico às mucosas jugais dos animais, conferido por uma agulha de ponta romba. Estas irritações eram utilizadas como fator potenciador da ação do quimioterápico. Tais abordagens foram, então, capazes de induzir lesões ulcerativas clinicamente detectáveis com mínima mortalidade (Sonis *et al.* 1990; Sonis *et al.* 1995).

No presente estudo, o fluorouracil causou lesão significativa nas mucosas jugais dos hamsters a partir do 5^o dia após o início da quimioterapia ou um dia após o trauma mecânico, atingindo valores máximos no 10^o dia. Tais achados foram corroborados pela análise histopatológica, a qual mostrou ingurgitamento e dilatação vasculares acentuadas, infiltrado celular intenso, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares, presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e de úlceras extensas. Esses resultados podem ser explicados considerando que, logo após a injúria produzida pelo quimioterápico e, aqui, potenciado pelas ranhuras nas mucosas jugais dos animais, inicia-se a fase dita vascular ou inflamatória. Nesta, ocorre a liberação de citocinas inflamatórias, resultando em dano tecidual e aumento da vascularização (Sonis 1998).

Os valores iniciais de mucosite encontrados correspondem, possivelmente, ao estágio epitelial, onde o agente quimioterapêutico afeta a

fase S do ciclo celular, resultando em taxas reduzidas de divisão celular no epitélio basal oral. Isto conduziu a uma menor renovação celular, atrofia e conseqüente ulceração (Sonis 1998).

Quanto aos valores máximos de mucosite oral observados, estes certamente correspondem à fase ulcerativa, a qual se desenvolve concomitantemente com uma colonização secundária por flora microbiana mista, em particular, bactérias Gram-negativas, o que fornece uma fonte de lipopolissarídeos. Tais endotoxinas podem, adicionalmente, estimular a liberação de citocinas a partir dos tecidos circundantes, exacerbando esta condição. Esta fase ulcerativa e (ou) bacteriológica é a mais sintomática e usualmente ocorre durante o período de grave neutropenia do paciente (Woo *et al.* 1993). A falta de renovação da mucosa reduz a eliminação dos microorganismos orais aderentes e aumenta o risco de penetração de substâncias químicas no epitélio. Além disso, os componentes do sistema imune da mucosa, como os linfócitos T e B, células de Langerhans e mastócitos, podem estar reduzidos quanto ao seu número e sua função em conseqüência da lesão destas células e (ou) mielossupressão induzidas pelas drogas (Schubert *et al.* 2000).

A partir do 12^o dia, as alterações tornaram-se significativamente reduzidas, regredindo, gradativamente, até que, no 16^o dia experimental, os aspectos avaliados encontraram-se praticamente resolvidos. Tais dados foram confirmados pela análise histopatológica, onde se observou diminuição significativa de leucócitos polimorfonucleares, da presença de áreas hemorrágicas, do edema, dos abscessos e das úlceras. Esses achados estão de acordo com os obtidos por outros autores, os quais demonstraram que animais com mucosite oral induzida da mesma forma, seguiram o curso evolutivo das lesões de forma bastante semelhante (Sonis *et al.* 1995).

Tem sido observado que o acúmulo de neutrófilos é uma característica de diversas alterações inflamatórias, tais como as dermatites e outras doenças infecciosas (Bradley *et al.* 1982), pois leucócitos circulantes podem migrar dos vasos para os tecidos, tanto sob condições normais, quanto em condições patológicas (Wagner & Roth 2000). Além disso, a presença de neutrófilos em lesões pode possuir uma correlação direta com o seu processo fisiopatológico. Durante as infecções, os neutrófilos podem ingerir e matar microorganismos, podendo-se reverter o processo. Desse modo, sabe-se que, em algumas situações, a presença desses leucócitos pode ser fator marcante em lesões inflamatórias seja para seu controle, seja para sua exacerbação (Bradley *et al.* 1982).

Com o intuito de verificar o conteúdo neutrofilico dos tecidos jugais, foram realizados ensaios de atividade da mieloperoxidase, pois essa enzima é considerada um importante marcador da presença de neutrófilos, dada a sua abundância nessas células (Bradley *et al.* 1982). Nossos resultados mostraram que o 5 fluorouracil foi capaz de causar um aumento significativo na quantidade de mieloperoxidase nas mucosas jugais dos animais no 10^o dia experimental, em comparação às quantidades de animais normais ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral. Assim, pode-se considerar que a mucosite oral induzida por este agente causou um aumento significativo do número de neutrófilos, o que justificaria crer que diversos mediadores inflamatórios possam estar participando dessas lesões, como prostaglandinas e citocinas (Wagner & Roth 2000).

Analisando o curso temporal da mucosite oral nesse modelo animal, verificou-se que o padrão de cinética da lesão está em consonância com o que se observa em sua forma em humanos, igualmente induzida por agentes quimioterápicos. Em relação aos aspectos sistêmicos, pacientes com mucosite e neutropenia possuem um risco relativamente maior de desenvolver septicemia do que os indivíduos sem mucosite (Eting *et al.* 1992). Parece que, tão logo se normalizem os níveis das células brancas no

sangue periférico, os processos de proliferação e diferenciação celulares tornam-se presentes e a fase de cicatrização das lesões se estabelece (Plevová 1999).

De fato, a quimioterapia na mucosite oral induzida alterou tanto a contagem total, como a diferencial dos leucócitos do sangue periférico nesse modelo animal. Observou-se leucopenia nos 4^o e 5^o dias, o que está de acordo com os observados por outros autores (Sonis *et al.* 1990). Provavelmente isso se deve à mielossupressão induzida pelo agente quimioterápico.

Entretanto, observou-se um pico de leucocitose no 10^o dia, às custas do aumento no número de neutrófilos. Esse achado não está em consonância com os encontrados por outros pesquisadores (Sonis *et al.* 1990), contudo, é perfeitamente compreensível tal neutrofilia diante de um quadro ulceroso passível de proliferação microbiana. Outros relatos mostram claramente que, nessa fase, a proliferação bacteriana normalmente ocorre e o status oral do hospedeiro contribui, de forma decisiva, para isso (Plevová 1999). Como era esperado, concomitantemente à cicatrização das lesões, a partir do 12^o até o 16^o dia, observou-se a normalização dos leucócitos sangüíneos periféricos.

Outro parâmetro observado nesse estudo consistiu na análise da variação de massa corpórea dos animais submetidos a mucosite oral induzida por 5-fluorouracil. Verificou-se perda significativa de massa corpórea a partir do 5^o dia, mantendo esse perfil até o 10^o dia experimental, quando então, os animais começaram a mostrar uma tendência a menor perda de massa corporal, em comparação à variação de massa corpórea dos animais normais, ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral.

Esses achados estão de acordo com os encontrados por outros autores, os quais mostraram que a mucosite oral induzida de maneira

semelhante causou perda significativa de massa corpórea até o 10^o dia, com tendência de recuperação de suas massas a partir do dia seguinte, até o 15^o dia (Sonis *et al.* 1997). Aparentemente, a perda de massa corpórea dos animais nesse estudo foi devida, também, ao trauma local conferido pelas ranhuras nas mucosas jugais, que os impedia de se alimentar normalmente e não apenas ao efeito mielossupressor do agente quimioterápico utilizado. De fato, quando se observou redução das lesões e da intensidade dos achados histopatológicos, além da normalização do leucograma, os hamsters mostraram uma tendência a menor perda de massa corpórea, embora não atingindo os valores, tomados paralelamente, de massa corporal dos animais normais.

Adicionalmente, outro aspecto foi verificado, como o surgimento de efeitos colaterais não apresentados como os mais relevantes. Nesse estudo, foi avaliado se além de ação estomatotóxica, o agente quimioterápico afetou outros sítios, como as mucosas gástricas. Assim, observou-se que o 5-fluorouracil, nas doses capazes de induzir a mucosite oral, causou aumento significativo do número de úlceras, de petéquias, áreas hemorrágicas, edemaciadas, descoloradas ou perdas de pregas das mucosas gástricas, quando comparado às de animais normais.

Esta atividade ulcerogênica nas mucosas gástricas é igualmente importante quando do manejo dessas lesões induzidas por quimioterápicos com drogas inibidoras de ciclooxigenases, cujo efeito colateral consiste em úlceras e erosões gástricas, via inibição da produção endógena de prostaglandinas, além da ação direta do fármaco no estômago e de substâncias tóxicas produzidas por neutrófilos (Bamba *et al.* 1998).

As pesquisas clínicas em prevenção e tratamento da estomatotoxicidade direta, até recentemente, tinham sido dificultadas devido a falta de modelos animais adequados (Wilkes 1998). Nesse sentido, considerando os aspectos acima expostos, parece razoável a utilização

desse modelo de mucosite oral induzida por antineoplásico para o estudo de tal entidade, pois, ao que tudo indica, o mesmo foi capaz de reproduzir as principais alterações vistas na mucosite oral em humanos (Sonis *et al.* 1990; Wilkes 1998). Contudo, é conveniente lembrar que a mucosite oral humana é, sobretudo, uma lesão multifatorial, contribuindo para o seu surgimento e a sua evolução, não apenas os efeitos estomatotóxicos diretos da quimioterapia antineoplásica, mas também, fatores locais como bactérias e suas toxinas, patógenos virais ou fúngicos, além de vários aspectos facilitadores da solução de continuidade da mucosa oral (Wilkes 1998).

Atualmente, não existe nenhuma intervenção que atue com pleno sucesso na prevenção e (ou) no tratamento da mucosite oral. Além disso, o tratamento padrão para esta complicação consiste em cuidados sintomáticos, com suportes analgésico e nutricional. Contudo, novos conhecimentos a respeito da fisiopatologia dessas lesões têm conduzido a muitas estratégias preventivas e terapêuticas das mucosites orais induzidas por antineoplásicos (Wilkes 1998). Dessa maneira, terapêuticas adjuvantes vêm sendo utilizadas com o intuito de modular o aparecimento das mucosites. Assim, drogas diversas que possam modular as respostas inflamatórias e (ou) imunes do hospedeiro, têm sido de grande valia, seja para tratar a própria lesão, seja para elucidar mecanismos capazes de intervir na sua evolução.

Devido o envolvimento de vários mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e as citocinas, na patogênese de diversos processos inflamatórios (Mitchell *et al.* 1994), buscou-se, nesse trabalho, utilizar estratégias farmacológicas que permitissem a modulação desses mediadores na mucosite oral induzida por quimioterápico, com o intuito de estudar a participação desses mediadores na sua fisiopatologia. Portanto, inibidores farmacologicamente seletivos ou não para COX-2 (como o celecoxib e a indometacina, respectivamente) e os seletivos ou não para

citocinas (como a talidomida e a pentoxifilina, respectivamente) foram utilizados.

Assim, o celecoxib (CLX) foi utilizado como abordagem farmacológica inicial nesse estudo. Trata-se de uma nova droga antiinflamatória não esteroidal que age como inibidor relativamente seletivo da COX-2 (Clemett & Goa 2000). Essa enzima é induzida em resposta a estímulos nocivos, o que conduz à síntese e ao acúmulo de prostanóides inflamatórios, em particular, as prostaglandinas E₂ (PGE₂). Isto, conseqüentemente, causa inflamação, edema e dor (Vane *et al.* 1998).

Considerando, por conseguinte, que o envolvimento de prostaglandinas na mucosite oral possa residir em modular processos inflamatórios, decidiu-se investigar se o celecoxib e, posteriormente, a indometacina alterariam o estabelecimento e (ou) a evolução dessas lesões em modelo de mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters.

Nesse estudo, o celecoxib alterou, de forma significativa, a intensidade dos aspectos inflamatórios macroscópicos avaliados, como eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, reduzindo, assim, a mucosite oral induzida por quimioterápico no 10 dias, considerando os escores macroscópicos. Observou-se que as doses de 7,5 e 15 mg/kg diminuíram tais lesões em 66,6%, quando comparadas aos animais não tratados. Estes achados foram corroborados pela análise histopatológica, a qual mostrou que essas doses reduziram a intensidade do infiltrado celular, a dilatação e o ingurgitamento vasculares, a hemorragia, o edema, a ulceração e a formação de abscessos, diminuindo, assim, a mucosite em 66,6% e 50%, respectivamente.

Tais resultados foram, até certo ponto, surpreendentes, pois a expectativa era que a inibição, por celecoxib, do processo inflamatório na mucosite oral induzida por quimioterápico, ocorresse de maneira direta e

dose dependente. Ao contrário, as doses maiores de celecoxib não foram capazes de reduzir tal fenômeno.

Uma explicação razoável para esse achado pode ser o fato de que à medida em que as doses foram sendo aumentadas ocorreu, também, a inibição da COX-1. Entretanto, estudos *in vivo* e *ex vivo* mostram que o celecoxib possui afinidade muito baixa pela COX-1, expressa constitutivamente (Clemett & Goa 2000), contudo, existe a possibilidade do celecoxib não ter sido altamente seletivo para COX-2. De fato, o celecoxib é tido como uma droga antiinflamatória não esteroideal que age com seletividade relativa para a COX-2 (Clemett & Goa 2000).

Entretanto, deve ser lembrado que a COX-2, expressa constitutivamente em diversos sítios, inclusive na mucosa do estômago (Mitchell & Evans 1998), possa, também, produzir mediadores benéficos e possuir os mesmos efeitos úteis da COX-1 ao nível das mucosas orais lesadas. Assim, a alta seletividade do celecoxib pode ter favorecido a persistência da inflamação devido a prevenção da síntese de prostanóides antiinflamatórios via COX-2 (Willoughby *et al.* 2000), os quais, nas mucosas orais, como em outros sítios do trato gastrointestinal (Schnitzer 2001), parecem possuir um papel importante para o restabelecimento da homeostasia.

Esse aspecto pode ser cotejado com outros estudos clássicos de inflamação, onde o celecoxib reduziu o processo inflamatório nas doses de 10 e 50 mg/kg em modelo de edema de pata de ratos induzido por zimosan, mas nas doses de 100 e 200 mg/kg, o celecoxib não apresentou tais efeitos, demonstrando, de fato, que o celecoxib é passível de perda de sua eficácia antiinflamatória em doses mais elevadas (Niederberger *et al.* 2001).

Quanto a essa ineficácia antiinflamatória, tem sido demonstrado que em células estimuladas por IL-1 β , o celecoxib, em concentrações produzidas

por doses equivalentes a 100 a 200 mg/kg, evocou uma superestimulação da transcrição do Fator Nuclear kappa B (NF-kB), resultando em uma produção aumentada de proteínas pró-inflamatórias, tais como a COX-2 e o TNF- α . Assim, a perda completa de eficácia antiinflamatória do celecoxib pode ser observada quando do uso de altas doses, por estimulação da transcrição de NF-kB, enquanto que o seu uso em doses terapêuticas estaria causando inibição desse fator, evidenciando, desse modo, seus efeitos antiinflamatórios (Niederberger *et al.* 2001).

No presente estudo, análises adicionais foram realizadas com o intuito de corroborar os achados macroscópicos e microscópicos das lesões presentes na mucosite oral induzida por fluorouracil. Considerando que as mudanças iniciais do processo inflamatório são inespecíficas histologicamente, os níveis de mieloperoxidase são um caminho útil de quantificação da resposta inflamatória precoce (Banerjee & Peters 1990). Tem sido sugerido que essa enzima é um importante marcador da presença neutrofílica (Bradley *et al.* 1982). Assim, este trabalho investigou tais alterações e mostrou claramente uma correlação direta entre quantidade de mieloperoxidase e a intensidade das lesões.

Foi observado que apenas as menores doses de celecoxib, 7,5 e 15 mg/kg, foram capazes de reduzir, de forma significativa, a atividade dessa enzima, indicando redução do número neutrófilos nas mucosas jugais dos animais, quando comparados às quantidades dessa enzima em animais normais ou seja, não submetidos a indução de mucosite oral. O motivo pelo qual a maior dose apresentou maior conteúdo neutrofílico, provavelmente envolve o fato da adesão leucocitária ser normalmente regulada de forma negativa pela liberação de prostaglandinas a partir do endotélio. Assim, a inibição da ciclooxigenase pela maior dose de celecoxib pôde resultar em um aumento na aderência dos leucócitos (Wallace *et al.* 1993), justificando, dessa maneira, a não prevenção da subsequente migração neutrofílica para as mucosas jugais.

Em relação ao efeito do celecoxib sobre o leucograma e a variação de massa corpórea dos animais submetidos a mucosite oral induzida por quimioterápico, observou-se que em nenhuma das situações esse fármaco foi capaz de prevenir a leucocitose e a perda de massa corpórea no 10º dia de mucosite oral em hamsters, apesar de ter havido uma tendência a menor perda de massa corporal pelos animais tratados com as menores doses de celecoxib, sem, contudo, apresentar diferença estatística.

Julgando-se que a leucocitose, nesse período, seja decorrente de infecção na mucosa, é perfeitamente compreensível que o celecoxib não tenha reduzido tal processo, visto que este fármaco é desprovido de atividade antimicrobiana. Além disso, em estudos clínicos, tem sido demonstrado que o celecoxib causou alterações insignificantes sobre os eventos hematológicos (Clement & Goa 2000). Quanto à perda de massa corpórea, o celecoxib, apesar de sua ação analgésica (Emery *et al.* 1999), não foi eficaz em favorecer a alimentação dos animais. Isto pode ser interpretado levando em conta que o efeito analgésico pode ter sido insuficiente para promover a analgesia da dor induzida pela mucosite oral nesse modelo, ou o trauma *per si* não representa o real motivo pelo qual os animais se alimentaram menos. Além disso, os mesmos não chegaram a apresentar qualquer episódio diarréico como outra forma de perda de massa corporal.

A seguir, no sentido de corroborar os achados relacionados ao tratamento com celecoxib, utilizou-se a indometacina, um derivado do ácido indolacético, o qual atua como um dos mais potentes inibidores da enzima COX-1. Além desta ação, ela inibe a motilidade dos leucócitos polimorfonucleares e a proliferação de células endoteliais, um aspecto relevante para a sua ação antiangiogênica (Pai *et al.* 2000).

Os resultados desse trabalho mostraram que a indometacina não foi capaz de inibir, de forma significativa, as principais alterações vistas na mucosite oral experimental no 10^o dia, aqui representadas pela presença e intensidade de eritema, de hiperemia, de edema, de hemorragia, de úlceras e de abscessos, nem a leucocitose ou a perda de massa corpórea induzidas por 5-fluorouracil. Entretanto, a indometacina apresentou um perfil perfeitamente coerente com sua atividade inibitória de ciclooxigenase, onde a ausência ou redução de prostaglandinas via COX-1 não preveniu as lesões decorrentes da indução da mucosite oral nesse modelo, ao contrário, observou-se uma tendência de exacerbação das lesões, sem, entretanto, significância estatística.

Adicionalmente, a indometacina favoreceu o surgimento de úlceras gástricas em animais submetidos a mucosite oral analisado no 10^o dia. Ainda, a dose de 1,0 mg/kg desse fármaco causou um maior espessamento da mucosa, além da presença aumentada do número de úlceras. Considerando que as prostaglandinas *via* COX-2 exercem um papel importante no processo de reparo das mucosas gástricas, é perfeitamente aceitável tal fenômeno ulcerogênico (Bamba *et al.* 1998). Em contra-partida, o celecoxib, na menor dose, eficaz em reduzir a mucosite oral, preveniu o surgimento de úlceras gástricas em animais submetidos a mucosite oral induzida. Esses dados demonstram o papel inflamatório ulcerogênico da indometacina devido a sua atividade inibitória da COX-1, enquanto que o celecoxib, usado em doses terapêuticas, pode ter um efeito protetor enquanto não existam úlceras gástricas (Bamba *et al.* 1998).

Em suma, os resultados sugerem que prostaglandinas, em pequenas quantidades, como as produzidas constitutivamente, são relevantes para a proteção da mucosa, visto que a indometacina causou tendência a piorar o processo inflamatório. No entanto, celecoxib, em doses menores, favoreceu uma citoproteção, enquanto que em concentração mais elevada, por evocar uma ativação de NF-κB, provavelmente, induziu a transcrição de genes pró-

inflamatórios adicionais, tais como COX-2 e TNF- α , o que contribuiu para piora do processo inflamatório.

Nesse sentido, isso, possivelmente, ocorreu porquê a ativação de COX-2 por citocinas leva a produção de concentrações mais elevadas de prostaglandinas que contribuem para a amplificação do processo de inflamação de mucosite oral. Isto implica que a eficácia e a segurança da droga dependem da sua dose correta. Dessa forma, enquanto as doses dos antiinflamatórios clássicos não seletivos, como a indometacina, estão limitadas pela toxicidade gastrointestinal, o celecoxib pode ser limitado pela perda de eficácia antiinflamatória em doses mais altas (Niederberger *et al.* 2001).

Considerando que citocinas podem, eventualmente, estimular a síntese de prostaglandinas e conseqüentemente, perpetuar a inflamação, escolheu-se, a seguir, a pentoxifilina. Tem sido descrito que esse agente possui importante atividade hemorreológica, a qual favorece a perfusão da microcirculação sangüínea de leitos periféricos e cerebrais, portanto, útil para a terapia de diversas doenças vasculares e que tem sido descrita capaz de inibir, de maneira relevante, a síntese de TNF- α , dentre outras citocinas (Doherty *et al.* 1991; Neuner *et al.* 1994).

Nesse estudo, a pentoxifilina alterou, de forma significativa, a intensidade dos aspectos inflamatórios avaliados, como eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, reduzindo, assim, a mucosite oral induzida por quimioterápico, durante 10 dias. Observou-se que todas as doses, 5, 15 e 45 mg/kg, diminuíram tais lesões em 66,6%, quando comparadas aos animais não tratados. Estes resultados foram corroborados pelos escores histopatológicos, os quais mostraram que essas doses reduziram a intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vasculares, hemorragia, edema, úlcera e abscessos, diminuindo, assim, a mucosite em 66,6%, 50% e 66,6%, respectivamente.

Esses achados podem ser comparados com dados relevantes da literatura, os quais mostram que a pentoxifilina pode atuar por supressão da transcrição do gene de TNF- α (Doherty *et al.* 1991; Neuner *et al.*, 1994). Este agente, derivado das metilxantinas, atua inibindo as fosfodiesterases PDE4 (Jimenez *et al.* 2001), favorecendo assim, o aumento das concentrações de AMPc (Pryhuber *et al.* 1998). Tem sido descrito que, ao nível molecular, as concentrações de AMPc elevadas inibem a ativação de NF-kB. A pentoxifilina pode, portanto, agir na produção de TNF- α , uma citocina dependente de NF-kB, através desta via de AMPc (Jimenez *et al.* 2001).

Adicionalmente, existem relatos que esse fármaco possui a capacidade de modular a resposta imune à luz de sua habilidade de inibir citocinas como a IL-2, a IL-6, a IL-12 e o INF- γ (Thanhauser *et al.* 1993; Moller *et al.* 1997b). Outros estudos, contudo, mostram que a pentoxifilina, em concentrações como 10^{-3} M inibiu a produção de IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10, e em concentrações de 10^{-4} M, observou-se um aumento na produção da IL-10, uma citocina antiinflamatória, sugerindo que este mediador apresenta uns padrões diferenciados de regulação, dependendo da dose da droga (D'Hellencourt *et al.* 1996).

Em relação ao estudo da atividade da mieloperoxidase, observou-se que, apesar das menores doses terem aumentado a dosagem de mieloperoxidase, a pentoxifilina, na dose de 45 mg/kg, reduziu, de forma significativa, tal dosagem nas mucosas jugais dos animais no 10^o dia, quando comparadas às quantidades de animais normais. Isso sugere uma redução na infiltração neutrofílica nesses tecidos.

Apesar da aparente discrepância, tem sido relatado que a pentoxifilina, de fato, é capaz de aumentar *in vitro* e *in vivo* a migração neutrofílica induzida por zimosan (Sullivan *et al.* 1984). Além disso, mais

neutrófilos foram encontrados em camundongos com infecções dérmicas por *S. aureus* quando tratados com pentoxifilina. Contudo, a sobrevivência desses animais foi aumentada (Sullivan *et al.* 1984). Estudos *in vitro*, no entanto, mostram que concentrações relativamente baixas de pentoxifilina, foram capazes de restaurar a migração de leucócitos polimorfonucleares induzida por fMLP (Sullivan *et al.* 1988). Tais resultados demonstram que a ação da pentoxifilina na migração neutrofílica parece não ser o evento crucial de sua atividade antiinflamatória.

Nos sítios inflamados ou infectados, a produção de citocinas inflamatórias pode, inicialmente, beneficiar o hospedeiro por promover o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares e ativação de suas funções microbicidas. É, portanto, provável que somente à medida que se utilizou uma dose maior, 45 mg/kg, nesse modelo de mucosite oral induzida por fluorouracil, observou-se redução do número de neutrófilos, sugeridos pela redução da dosagem de mieloperoxidase. Este fato ocorreu, possivelmente, devido à inibição subsequente de novas citocinas, reduzindo assim, um estímulo adicional à quimiotaxia dos leucócitos, pois o contrário, a persistência dos neutrófilos ativados, de forma prolongada, disseminada ou excessiva, poderia iniciar e (ou) perpetuar injúria microvascular (Movat *et al.* 1987), o que, de fato, foi prevenido.

Quanto ao efeito da pentoxifilina, nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, sobre o leucograma e a variação de massa corpórea dos animais submetidos à mucosite oral induzida por quimioterápico, observou-se que este fármaco foi capaz de prevenir de maneira significativa e dose dependente a leucocitose e a perda de massa corpórea no 10^o dia de mucosite oral em hamsters.

A neutrofilia, nesse modelo animal, possivelmente ocorreu de forma secundária à produção de substâncias quimiotáticas induzidas por bactérias, como os lipopolissacarídeos, ou ainda, por citocinas derivadas do

hospedeiro. Assim, neutrófilos liberados a partir da medula óssea ou de outros sítios de estoque foram, provavelmente, direcionados para o foco sob a ação de múltiplas citocinas pró-inflamatórias (Reynolds 1999). A pentoxifilina, nesse estudo, possivelmente reduziu a leucocitose e conseqüentemente o número de neutrófilos dada a sua habilidade de inibir a síntese de citocinas quimiotáticas, sugerindo que este agente agiu nesse modelo como um importante antiinflamatório (Hammerschmidt *et al.* 1988).

A perda de massa corpórea pode ser um reflexo de vários fenômenos fisiológicos, como trauma, cirurgia, mal-absorção ou *sepsis*. Anormalidades na boca ou no trato digestivo, resultantes tanto de doenças como de drogas, podem interferir com a ingestão de alimentos (Nelson *et al.* 1994). Nesse estudo, os animais tratados com pentoxifilina e submetidos a mucosite oral induzida por quimioterápico e associação com trauma na mucosa jugal apresentaram significativa redução da perda de massa corpórea, possivelmente devido ao efeito inibidor de citocinas desta droga, como o TNF- α , o qual tem sido demonstrado participar de vários fenômenos de desgaste celular, inclusive na caquexia do câncer (Toomey *et al.* 1995).

Em resumo, considerando os parâmetros avaliados, é possível que o efeito da pentoxifilina nesse modelo de mucosite oral induzida por fluorouracil tenha ocorrido via inibição da produção de TNF- α e (ou) de outras citocinas pró-inflamatórias, através da via AMPc/NF-kB, sem relegar, no entanto, a capacidade dessa droga em estimular a produção da IL-10, uma citocina antiinflamatória (Jimenez *et al.* 2001).

Com o intuito de avaliar a participação efetiva do TNF- α nessas lesões induzidas por fluorouracil, usou-se, a seguir, a talidomida, um agente hipnosedativo que, apesar de ter sua comercialização proibida, vem sendo seletivamente reintroduzido na prática clínica como droga de escolha para o tratamento de várias desordens sistêmicas. Sua importância reside principalmente no seu efeito inibitório sobre a produção de TNF- α através do

aumento da degradação de seu RNA mensageiro (Moreira *et al.* 1993) sem, contudo, afetar a produção de outras citocinas, tais como IL-1, IL-6 ou GM-CSF (Sampaio *et al.* 1991).

Nesse estudo, a talidomida alterou, de forma significativa, a intensidade dos aspectos inflamatórios avaliados, como eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, reduzindo, assim, a mucosite oral induzida por quimioterápico, durante 10 dias. Observou-se que todas as doses, 10, 30 e 90 mg/kg, diminuíram tais lesões em 66,6%, quando comparadas aos animais não tratados. Estes resultados foram confirmados pela análise histopatológica, a qual mostrou que tais doses reduziram em, pelo menos, 50% a intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamentos vasculares, hemorragia, edema, úlcera e abscessos, diminuindo, assim, a mucosite.

Diversos estudos têm demonstrado a atividade imunomoduladora da talidomida em várias doenças. Tem sido descrito que esse fármaco bloqueia a produção de TNF- α por aumentar a degradação de seu RNA mensageiro (Moreira *et al.* 1993). Além disso, a talidomida também causa inibição da ativação NF-kB induzida por TNF- α (Keifer *et al.* 2001; Majumdar *et al.* 2002). A regulação positiva dos genes de TNF- α , além de IL-8 e IL-12, pode ocorrer através da ativação do fator transcricional NF-kB. Assim como ocorreu com a pentoxifilina, a redução da mucosite oral obtida por talidomida pode ter sido resultado do efeito inibitório da síntese de TNF- α , visto que a inibição de NF-kB pode explicar vários efeitos da talidomida. Outro efeito importante refere-se a sua atividade antiangiogênica. Esse fenômeno, de fundamental importância no desenvolvimento de tumores (Bauer *et al.* 1998), requer igualmente a ativação de NF-kB (Keifer *et al.* 2001). Assim, é possível que a talidomida tenha reduzido os principais achados inflamatórios da mucosite oral induzida por fluorouracil nesse estudo através do aumento da degradação do RNAm de TNF- α ou via inibição da ativação de NF-kB, sugerindo que a mesma pode ter agido por múltiplos mecanismos.

A excessiva produção de várias interleucinas, de TNF, de metabólitos do ácido araquidônico e de outras substâncias decorrentes de neutrófilos e macrófagos resultam em injúria sistêmica das células endoteliais (Dunzendorfer *et al.* 1997). Nesse trabalho, a talidomida, na dose de 10 mg/kg, causou redução significativa do número de neutrófilos nas mucosas jugais dos animais no 10^o dia, quantificados a partir de suas enzimas mieloperoxidases, quando comparadas às quantidades de neutrófilos de animais normais, ou seja, não submetidos à indução de mucosite oral. As doses maiores, no entanto, não apresentaram o mesmo padrão protetor.

Tem sido demonstrado que níveis excessivos de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- α , são capazes de resultar em diversas alterações teciduais. Entretanto, níveis muito baixos, causados pelas doses mais elevadas de talidomida, podem favorecer, por exemplo, a *sepsis*, visto que a inflamação é um processo necessário ao combate de organismos patogênicos e para promover a resolução da doença (Bone 1996). Nesse sentido, a migração de neutrófilos, provavelmente, continuou a ocorrer via estímulos quimiotáticos variados, como outras interleucinas e (ou) endotoxinas bacterianas.

Em relação ao efeito da talidomida, nas doses de 10, 30 e 90 mg/kg, sobre o leucograma dos animais submetidos a mucosite oral induzida por quimioterápico, observou-se que este fármaco foi capaz de prevenir de maneira significativa a leucocitose, reduzindo o número de neutrófilos e de mononucleares no 10^o dia em hamsters submetidos a mucosite oral experimental por fluorouracil, evidenciando assim, a repercussão sistêmica protetora desse tratamento.

Quanto à variação ponderal, observou-se, porém, que a talidomida não reduziu, de forma estatisticamente significativa, a perda de massa corpórea dos animais induzida pela mucosite oral experimental quando

comparada à variação dos animais não tratados. Esse resultado foi, até certo ponto, inesperado, visto que seu efeito inibitório da síntese de TNF- α parece não ter sido suficiente para prevenir a perda de massa corporal nesse modelo animal. Considerando que o TNF- α está envolvido em vários processos de desgaste celular e conseqüente perda de massa corporal (Toomey *et al.* 1995), a não proteção da talidomida foi surpreendente, pois inibidores de diversas outras citocinas, como a pentoxifilina, promoveu uma redução significativa da perda ponderal nesses animais submetidos a mucosite oral por fluorouracil.

Adicionalmente, devido a ação analgésica (Ribeiro *et al.* 2000) e sedativa (Eriksson *et al.* 2001) da talidomida, esperava-se que os animais pudessem se alimentar mais facilmente, dada a redução da dor no local da injúria. Por outro lado, o seu efeito sedativo pode, de fato, ter simplesmente diminuído a tendência dos animais de se alimentarem, pela sonolência resultante. Em um outro estudo, utilizando talidomida por um período de 11 dias, também não se observou proteção de perda de massa corporal, não obstante a redução significativa de reabsorção óssea periodontal (Lima *et al.* 2004). Nesse caso, a dose utilizada de 5 mg/kg, cuja sedação dos animais era evidentemente reduzida, observou-se uma tendência, embora sem significância estatística, a menor perda ponderal (Lima 1999).

Em suma, a mucosite oral induzida por fluorouracil em hamsters parece ser um processo complexo onde mediadores inflamatórios podem potencialmente participar, dada a atividade redutora por parte de drogas inibidoras de prostaglandinas, como o celecoxib, e mais decisivamente, de citocinas como a pentoxifilina e, seletivamente de TNF- α , como a talidomida, terem apresentado um efeito protetor nessas lesões. Considerando o exposto, a magnitude desta inibição foi inesperada, dado o papel primário previamente descrito de prostaglandinas em diversos processos inflamatórios. O efeito dos inibidores de TNF- α e de outras citocinas pode ser devido à sua função como mediador primário na resposta inflamatória, enquanto que as

prostaglandinas devem, potencialmente, possuir um papel mais secundário na mucosite oral induzida por fluorouracil.

Até o presente momento, consta-nos que não existe demonstração consistente do real papel das prostaglandinas ou do TNF- α na patogênese das mucosites orais. Dessa maneira, considerando os nossos resultados aqui tratados, é razoável supor que tais mediadores possam-se fazer presentes no processo inflamatório dessas lesões. Sugerem-se, com isso, que as abordagens farmacológicas aqui utilizadas possam ser úteis em estudos complementares e em protocolos clínicos com pacientes submetidos a quimioterapia antineoplásica.

Dando continuidade ao nosso trabalho, estudamos a mucosite intestinal que, dada a maior dificuldade de acesso às áreas entéricas, consiste numa das formas de afecção induzida por drogas antineoplásicas menos compreendida. Nesse estudo, tais alterações foram induzidas em ratos, visto que esta espécie mostrou-se adequada para o estudo por possuir importante tolerabilidade às doses de metotrexato capazes de induzir a mucosite intestinal, sem mortalidade significativa (Vanderhoof *et al.* 1990). Além disso, semelhanças fisiopatológicas e imunológicas com as manifestações em humanos, tornam esse modelo animal apropriado ao estudo da mucosite intestinal (Bhatti & Hodgson 1995).

Tem sido descrito que o epitélio pode ser danificado por estímulos patológicos como drogas ou radiação e por produtos de reações imunes e inflamatórias (Wilson & Gibson 1997). Assim, para simular as injúrias intestinais, foram administradas três doses subseqüentes de metotrexato, em ratos *Wistar*. Em estudos preliminares os ratos receberam doses de 1,5, 2,5 e 3,5 mg/kg, subcutaneamente, durante três dias, a fim de se escolher a dose que produzisse uma injúria consistente, com um mínimo de letalidade. Observou-se que, embora todas as doses tenham produzido danos

consistentes nas mucosas intestinais, dentro de 40 horas após a terceira administração do antineoplásico, a dose de 2,5 mg/kg produziu mucosite intestinal com importante redução da taxa de mortalidade em relação à maior dose. Tais dados foram demonstrados pela análise histopatológica, a qual evidenciou que o metotrexato causou achatamento significativo dos vilos intestinais e aumento da profundidade das criptas, o que indica a tentativa de recuperação do epitélio, além de aumento da infiltração de leucócitos na lâmina própria e solução de continuidade do epitélio. Adicionalmente, os citados efeitos ocorreram primariamente no duodeno, seguido pelo jejuno e em menor intensidade, no íleo.

Esses achados estão de acordo com os encontrados por outros autores, os quais mostraram que mudanças inflamatórias graves ocorreram dentro de três dias após a quimioterapia em modelo animal semelhante ao utilizado neste estudo, com infiltração de polimorfonucleares e linfócitos na lâmina própria, marcante achatamento dos vilos e perda de continuidade do epitélio, especialmente na porção proximal do intestino delgado, isto é, no duodeno, e em menor grau em sua porção distal, no íleo (Vanderhoof *et al.* 1990).

Diversos pesquisadores têm demonstrado que drogas antineoplásicas podem causar atrofia da mucosa intestinal e aumento de sua permeabilidade. Ambos os insultos, local e sistêmico, podem causar danos a esta mucosa, favorecendo, dessa maneira, a translocação de bactérias (Bai *et al.* 1996). A citotoxicidade desses fármacos afeta não apenas as células tumorais, mas, também, as células do hospedeiro que apresentam rápida proliferação, como as da mucosa do trato gastrointestinal. Assim, agentes quimioterápicos freqüentemente produzem injúrias tanto estruturais, como funcionais, resultando, comumente, em grave mucosite (Bai *et al.* 1996).

Com o intuito de se verificar as alterações de permeabilidade e absorção das mucosas intestinais, foram administradas por via oral,

soluções de lactulose e manitol aos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. Tem sido observado que a recuperação de tais solutos na urina pode ser utilizada como forma de detecção não invasiva de alteração de permeabilidade intestinal (Bijlsma *et al.* 1995). Portanto, uma taxa aumentada de excreção de lactulose e de manitol é, usualmente, indicativa de mudanças na função de barreira e (ou) na morfologia do intestino delgado, respectivamente. O aumento na permeabilidade a substâncias antigênicas presentes no lúmen e atrofia dos vilos podem resultar em respostas alérgicas, infecções e distúrbios de absorção de nutrientes (Travis & Menzies 1992).

Desse modo, a medida de permeabilidade intestinal baseada na quantificação de dois açúcares de tamanhos diferentes fornece mais informações e mostra uma alta sensibilidade em desordens gastrointestinais do que estudos utilizando um único açúcar-teste (Person *et al.* 1982). Assim, a lactulose e o manitol, devido a suas características hidrofílicas e lipofóbicas, foram os açúcares preferidos. Eles apresentam uma afinidade pequena pelo sistema de transporte da mucosa intestinal, sendo, por isso, absorvidos passivamente. Ainda, possuem a vantagem de não serem metabolizados (Laker & Menzies 1977).

A absorção da lactulose, um dissacarídeo, cujo raio molecular é de 0,52 nm, ocorre de forma paracelular, via zonas de oclusão e de extrusão nas pontas dos vilos. Ao contrário, a rota de absorção do manitol, um monossacarídeo, com raio molecular de 0,40 nm, ocorre de forma transcelular através dos poros aquosos presentes na membrana celular. Por que a lactulose e o manitol são açúcares não metabolizáveis, ambos são excretados inalterados na urina (Bai *et al.* 1996; Carneiro-Filho *et al.* 2004). Assim, as quantias de lactulose e de manitol eliminadas refletem diretamente a quantidade absorvida. A lactulose, em contraste ao manitol, normalmente, não é ou é muito pouco absorvida. Portanto, quando eventualmente ocorre um aumento de lactulose na urina, isto indica permeabilidade intestinal

aumentada, via zonas de oclusão alteradas. Quando há alteração da excreção do manitol, é indicativo de modificação nos aspectos morfológicos dos vilos, isto é, na superfície absorptiva. Por fim, quando a lactulose e o manitol são administrados simultaneamente, a sua excreção urinária é freqüentemente expressada como taxa de lactulose/manitol (Bai *et al.* 1996; Carneiro-Filho *et al.* 2004) aumentado é indicativo de lesão da mucosa observada.

Nossos resultados mostraram que a mucosite intestinal induzida por metotrexato em ratos causou alterações significativas sobre tais mucosas analisadas pelo teste da lactulose e manitol, quando comparadas às dos ratos normais. Apesar de não ter havido diferença estatística quanto ao percentual de excreção de lactulose entre os grupos, não caracterizando necessariamente a ocorrência de alterações ao nível das zonas de oclusão intercelulares, observou-se diminuição significativa do percentual de excreção de manitol, demonstrando assim, redução da área absorptiva do epitélio intestinal, decorrente da atrofia dos vilos. Finalmente, a taxa de lactulose/manitol igualmente aumentada, denotou a presença de lesão intestinal.

Esses dados estão em consonância com os encontrados por outros autores os quais mostraram que altas doses de quimioterápicos são capazes de afetar a permeabilidade intestinal em humanos avaliada através de testes utilizando soluções de lactulose e de ramnose (Keefe *et al.* 1997). Ainda, outros estudos mostraram que o manitol, teoricamente, transita através da porção hidrofílica da membrana celular, enquanto que a lactulose atravessa as zonas de oclusão e as de extrusão dos espaços entre os vilos intestinais. Conseqüentemente, a perda de integridade da mucosa pode, de fato, causar absorção aumentada de lactulose, enquanto que a perda da área absorptiva diminui a absorção do manitol (Fleming *et al.* 1990).

Com o intuito de se verificar outros aspectos que podem representar repercussão sistêmica, avaliou-se o efeito do metotrexato sobre o leucograma dos ratos. Nesse estudo, ocorreu leucopenia acentuada às custas da redução do número de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos. Esses dados, possivelmente, estão relacionados ao efeito mielossupressor da droga, o qual pode ser manifestado na forma de leucopenia e trombocitopenia (Kwok & Schubert 2000).

Como a perda de massa corpórea pode representar um importante parâmetro nesse modelo, estudou-se a variação de massa corporal dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato, bem como as variações de ingestão de líquidos e alimentos. Observou-se que o agente antineoplásico utilizado foi capaz de causar perda significativa de massa corpórea, mantendo esse perfil por todo o período experimental de 5 dias, em comparação à variação de massa corpórea dos animais normais ou seja, não submetidos à mucosite intestinal.

Paralelamente, foram realizadas as avaliações das variações de ingestão de líquidos e de alimentos. Observou-se que o metotrexato causou redução significativa de ingestão de líquidos a partir do 3º dia, e de alimentos a partir do 3º dia. Em ambas as situações, mantiveram esses perfis até o sacrifício, no 5º dia, em comparação às variações de ingestões de líquidos e de alimentos dos animais normais.

Tem sido descrito que, dentre os diversos efeitos tóxicos do metotrexato, como a mielossupressão e a própria mucosite intestinal (Kwok & Schubert 2000), o mal-estar geral, os vômitos, a anorexia, as dores abdominais e, principalmente, as diarreias (Sinicrope & Levin 2000), são importantes fatores contributivos para as debilidades das condições sistêmicas de pacientes submetidos à quimioterapia antineoplásica (Kwok & Schubert 2000). Em muitos casos, esses sinais e sintomas conduzem à

redução ou mesmo à suspensão do tratamento (Sinicrope & Levin 2000). Dessa maneira, pode-se inferir que a perda de massa corporal dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato pôde ser devida ao menor consumo de alimentos e líquidos, somados aos eventuais episódios diarréicos dos mesmos nesse estudo (dados não mostrados).

Adicionalmente, o aumento da produção de TNF- α , citocina considerada envolvida em vários processos de desgaste celular (Toomey *et al.* 1995), pode representar um incremento à conseqüente perda de massa corporal desses animais. De fato, sua presença foi confirmada pelo estudo imunohistoquímico das mucosas duodenais dos ratos submetidos a mucosite intestinal por metotrexato, no qual se observou um aumento das marcações de TNF- α , não apenas ao nível de epitélio de revestimento, mas também, estendendo-se pela lâmina própria e submucosa, quando comparado às mucosas intestinais de animais normais, as quais apresentam marcação apenas nas células epiteliais de revestimento.

A toxicidade do metotrexato na prática convencional está bem descrita, sendo que a mucosite intestinal consiste num dos seus efeitos colaterais mais importantes (Kamen *et al.* 2000). Contudo, muitos dos aspectos envolvidos em seu mecanismo citotóxico encontram-se por ser elucidados. Infelizmente, não existe, até o momento, nenhuma intervenção realmente eficaz e definitivamente preventiva, ou mesmo terapêutica, dessas lesões. Assim, faz-se necessário um maior número de estudos pré-clínicos que facilitem a identificação de estratégias capazes de reduzir ou eliminar tais toxicidades. Nesse sentido, a dose de 2,5 mg/kg de metotrexato foi a escolhida para se proceder a indução de mucosite intestinal em ratos, visto que esse modelo animal parece ser capaz de mimetizar as principais alterações vistas na mucosite intestinal humana induzida por quimioterápicos (Vanderhoof *et al.* 1990).

Vale salientar, entretanto, que existem algumas informações relevantes concernentes a mecanismos específicos desta entidade, onde mediadores inflamatórios podem potencialmente interferir no curso evolutivo dessas lesões. Por isso, buscou-se, nesse estudo, avaliar o perfil farmacológico de drogas que reconhecidamente permitam a modulação desses mediadores na mucosite intestinal induzida por metotrexato, com o intuito de interferir em possíveis pontos responsáveis pela sua fisiopatologia.

Dado, portanto, o envolvimento de prostaglandinas e de citocinas na patogênese de diversos processos inflamatórios, onde a COX-2 pode ser induzida via estímulo inflamatório, presumivelmente, através da produção de citocinas (Mitchell *et al.* 1994) foram utilizados inibidores farmacologicamente seletivos para COX-2, como o celecoxib, e os seletivos ou não para citocinas, como a talidomida e a pentoxifilina, respectivamente.

Assim, o celecoxib (CLX) foi selecionado como primeira abordagem farmacológica no estudo da mucosite intestinal, com o objetivo de diminuir a síntese de prostaglandinas via inibição da COX-2. Observou-se que CLX, na dose de 30 mg/kg, foi capaz de reduzir, de forma significativa, a relação entre o encurtamento dos vilos e o aumento da profundidade das criptas de segmentos de duodeno, jejuno e íleo, em 37,3%, 42,2% e 29,8%, respectivamente. No entanto, apesar da proteção aqui representada, nenhuma das doses utilizadas de celecoxib foi capaz de prevenir solução de continuidade do epitélio intestinal, nem a infiltração leucocitária.

Nesse estudo, o celecoxib, nas menores dosagens, isto é, 7,5 e 15 mg/kg, possivelmente não promoveu proteção ao epitélio intestinal por se tratar de doses insuficientes para uma redução significativa de prostaglandinas via COX-2. Em contra-partida, a maior dose utilizada, 30 mg/kg, embora pareça ter sido útil sob o ponto de vista morfológico, não foi, na realidade, eficiente na prevenção de danos.

De fato, este aspecto pode ser corroborado pelo estudo da permeabilidade intestinal realizado pelo teste da lactulose e manitol, onde o tratamento com CLX, na dose de 30 mg/kg, favoreceu danos às zonas de oclusão, dada a absorção de lactulose aumentada. Por outro lado, foi capaz de prevenir, de forma significativa, a redução da área absorptiva do epitélio intestinal induzida nesse modelo, dada a maior excreção de manitol, em animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. Em suma, a observação de redução significativa da taxa de lactulose/manitol excretada por celecoxib, é indicativa, de diminuição geral da lesão intestinal induzida pelo metotrexato.

Esses resultados são perfeitamente compreensíveis, uma vez que se observou, pelo estudo histomorfométrico, uma menor atrofia de vilos ou aumento da profundidade das criptas, mas isso, necessariamente, não ocorreu concomitantemente à preservação das zonas de oclusão. Dada a capacidade do celecoxib, em concentrações altas, evocar a ativação de NF- κ B, é possível, portanto, a indução da transcrição de genes pró-inflamatórios adicionais, tais como COX-2 e TNF- α (Niederberger *et al.* 2001), explicando, assim, a não preservação dessas junções intercelulares, pela perda parcial de sua eficácia, especialmente na maior dose, de 30 mg/kg.

Em relação ao efeito do celecoxib sobre o leucograma dos animais submetidos a mucosite intestinal induzida por antineoplásico, observou-se que esse tratamento, na dose de 30 mg/kg, durante cinco dias, alterou as contagens do número de leucócitos total e diferencial no sangue periférico dos animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. Dessa maneira, o celecoxib reduziu, de forma significativa a leucopenia, por diminuir a neutropenia e o já baixo número de leucócitos mononucleares observados na mucosite intestinal experimental, mostrando, assim, seu efeito protetor sobre a medula óssea.

Entretanto, o tratamento com CLX não reverteu de forma significativa a perda de massa corpórea induzida pela mucosite intestinal, quando comparada à variação de massa corpórea de animais normais, ou seja, sem mucosite. Observa-se, porém, uma tendência à recuperação de suas massas, embora sem haver diferença estatisticamente significativa, quando relacionadas às massas dos animais submetidos a mucosite oral experimental não-tratada. Esses achados são facilmente compreendidos, dado o celecoxib não ter sido capaz de reverter os baixos consumos de líquidos e de ração dos animais submetidos a mucosite intestinal, quando comparados às variações de consumo dos ratos normais. Além disso, tem sido mostrado que o tratamento com celecoxib em pacientes provocou maior frequência de episódios diarréicos, o que contribuiu para a perda de peso dos mesmos (Lefkowitz 1999).

Existem evidências crescentes de que, em muitas circunstâncias, a COX-2 exerça um papel fisiológico importante, aumentando, dessa maneira, a possibilidade de que, em determinados sítios, o uso de inibidores seletivos possa resultar em efeitos adversos (Barnett *et al.* 2000). De fato, tem sido demonstrado que a estimulação da produção de prostaglandinas protetoras pode inibir uma injúria precoce ao nível intestinal, além de favorecer a sua cicatrização. A síntese de prostaglandinas, portanto, parece ser um mediador relevante na integridade das mucosas e homeostasia do trato gastrointestinal (Tessner *et al.* 1998). Por outro lado, sua inibição pôde representar um efeito modulador dos fenômenos aqui relacionados. Nesse caso, as prostaglandinas, via COX-2, podem ser fundamentais nos processos estruturais, embora não decisivas nos efeitos funcionais da mucosa intestinal. O celecoxib representou, até certo ponto, um agente com um perfil protetor, no máximo, moderado, nesse modelo de mucosite intestinal induzida por metotrexato, devida sua dualidade de efeitos.

Tem sido bem documentado um aumento de síntese de prostaglandinas derivadas de COX-2 durante inflamações intestinais aguda e crônica (Ficchio 1998). Assim, dada a relevância da expressão da COX-2 na inflamação intestinal e na carcinogênese, é importante compreender os mecanismos que regulam sua expressão (Mifflin *et al.* 2002). Considerando que o celecoxib, em altas concentrações, foi capaz de induzir a transcrição de genes de mediadores pró-inflamatórios adicionais, tais como COX-2 e TNF- α , o que possivelmente limitou a sua eficácia antiinflamatória em doses mais altas, observando, de fato, uma tendência a piora do quadro (Niederberger *et al.* 2001), buscou-se, a seguir, estudar o efeito modulador da pentoxifilina e da talidomida sobre citocinas nesse modelo de mucosite intestinal.

A pentoxifilina, principalmente na dose de 15 mg/kg, foi capaz de inibir, de forma significativa, as principais alterações vistas na mucosite intestinal experimental, aqui representadas pela relação entre encurtamento dos vilos e aumento da profundidade das criptas de segmentos de duodeno, jejuno e íleo, em 38,1%, 36,8% e 30,7%, respectivamente. Adicionalmente, este fármaco foi capaz de prevenir, claramente, a solução de continuidade do epitélio intestinal, além de reduzir a infiltração leucocitária, aspecto não observado com o uso de celecoxib.

Tem sido demonstrado que a pentoxifilina, um agente derivado das metilxantinas e inibidor das fosfodiesterases, reduz a produção de TNF- α pela inibição da transcrição do seu gene (Sampaio *et al.* 1998). Considerando que a síntese de tal citocina é dependente de NF-kB (Jimenez *et al.* 2001), juntamente com a informação de que doses maiores de celecoxib estariam ativando NF-kB, evocando, assim, a participação de genes inflamatórios como a da COX-2 e do próprio TNF- α , é compreensível, agora, o efeito inibitório mais expressivo da pentoxifilina nesse modelo animal. Assim, é possível a participação de TNF- α na mucosite intestinal induzida por metotrexato.

De fato, a pentoxifilina, na dose de 15 mg/kg, utilizada durante cinco dias, foi capaz de prevenir, de forma significativa, a perda de área absorptiva do epitélio intestinal, dada a maior excreção de manitol, em animais submetidos a mucosite intestinal. Adicionalmente, observou-se redução significativa da lesão intestinal induzida pelo metotrexato, aqui representada pela redução da taxa de lactulose/manitol excretados. Esse fármaco, portanto, apresentou um efeito protetor da mucosite intestinal nesse estudo.

Entretanto, a pentoxifilina não foi capaz de reverter as contagens do número de leucócitos total e diferencial no sangue periférico dos animais, isto é, não se observou redução da leucopenia determinada pela neutropenia e pela linfomonocitopenia observadas na mucosite intestinal experimental. Isto, provavelmente se deve a própria habilidade da pentoxifilina de inibir a síntese de citocinas, o que é condizente com sua atividade inflamatória (Hammerschmidt *et al.* 1988).

Contudo, observou-se, nesse estudo, que o tratamento com pentoxifilina, em todas as doses, reverteu, de forma significativa, a perda de massa corpórea induzida pela mucosite intestinal, quando comparada à variação dos animais com mucosite intestinal não tratada, embora não ter sido observada igualdade de suas massas, às dos ratos normais. Isto, à semelhança do que foi relacionado anteriormente na mucosite oral, possivelmente, é devido ao efeito inibidor de citocinas desta droga, como o TNF- α , o qual tem sido demonstrado participar de vários fenômenos de desgaste celular, inclusive na caquexia do câncer (Toomey *et al.* 1995).

Além disso, vale ressaltar que tal tratamento não reverteu, de forma significativa, as baixas ingestões de líquidos ou de alimentos observadas em animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato, quando comparadas às variações desses por ratos normais, o que vem reforçar a possível participação de TNF- α nesse modelo de mucosite intestinal. Nesse

sentido, pode ser conveniente sugerir a participação de citocinas como TNF- α nesse processo de mucosite intestinal induzida por metotrexato, não obstante outros mediadores inflamatórios possam se fazer presentes.

A fim de avaliar a participação efetiva do TNF- α nas lesões induzidas por metotrexato, usou-se, a seguir, a talidomida, como inibidor seletivo de TNF- α . Observou-se inibição significativa das principais alterações vistas na mucosite intestinal experimental, aqui representadas pelo encurtamento dos vilos e aumento da profundidade das criptas de segmentos de duodeno e jejuno, respectivamente, em 37,0% e 26,0 % (TLD 30 mg/kg) e 28,9% e 22,1 % (TLD 90 mg/kg). Esses achados foram corroborados pelo teste da lactulose e manitol. Assim, a talidomida, na maior dose utilizada, foi capaz de prevenir, de forma significativa, a perda de área absorptiva do epitélio intestinal, dada a maior excreção de manitol, em animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato. Concluindo, observou-se redução significativa da lesão intestinal induzida pelo metotrexato, aqui representada pela redução significativa da taxa de lactulose/manitol excretados.

As funções da talidomida no organismo não são completamente compreendidas. Contudo, suas atividades antiinflamatórias e imunomodulatórias têm sido descritas (Calabrese & Fleischer 2000). A talidomida, embora não tão eficientemente, mas seletivamente, inibe a produção de TNF- α em monócitos humanos (Sampaio *et al.* 1991; Moreira *et al.* 1993), de uma maneira dose-dependente, sem nenhum efeito sobre a síntese de outras citocinas. A inibição da produção, no entanto, não é completa (Sampaio *et al.* 1991; Klausner *et al.* 1996).

Assim, é possível que o efeito protetor moderado observado nesse estudo esteja condizente com sua capacidade em inibir parcialmente a produção de TNF- α ou, simplesmente, a mucosite intestinal induzida por metotrexato consiste num processo multifatorial, contribuindo para isso, a participação de diversos outros mediadores inflamatórios.

Avaliou-se, portanto, o efeito da talidomida, na dose de 90 mg/kg, pelo estudo imunohistoquímico das mucosas intestinais de ratos submetidos a mucosite intestinal, e tratada com este fármaco. Observou-se redução evidente da marcação de TNF- α , tanto ao nível de epitélio de revestimento intestinal, como também, da lâmina própria, quando comparada à mucosa com mucosite não tratada. Esta evidenciou, além das marcações de TNF- α ao nível do epitélio intestinal, células ao nível de lâmina própria. Sugere-se, então, que a talidomida atuou, no mínimo, inibindo o aumento da produção de TNF- α na mucosite intestinal por metotrexato.

Em relação ao estudo hematológico, foi evidenciado que a talidomida, na mesma dose anteriormente citada, não foi capaz de reduzir, de forma significativa a leucopenia, a neutropenia, nem a linfomonocitopenia observadas na mucosite intestinal experimental. Tal parâmetro, coerente com a mielossupressão induzida pelo uso do metotrexato, possivelmente não foi prevenido pelo tratamento com talidomida devido a sua própria capacidade indutora de neutropenia. De fato, em um estudo clínico randomizado, onde talidomida ou placebo foi administrado para uso na *doença enxerto versus hospedeiro* crônica, a talidomida teve de ser suspensa em 92% dos pacientes por causa de seus efeitos colaterais, neutropenia e sintomas neurológicos (Koc *et al.* 2000).

Adicionalmente, a talidomida, em nenhuma das doses utilizadas, foi capaz de reverter, de forma significativa, a perda de massa corpórea induzida pela mucosite intestinal, quando comparada à variação de massa corpórea de animais normais. Essa ausência de proteção, no entanto, não parece ser coerente com sua atividade anticaquexia, via inibição de TNF- α . Contudo, como o TNF- α pode exercer sua influência em respostas metabólicas, de uma maneira autócrina ou parácrina, em tecidos metabolicamente importantes, a sua inibição pode não se refletir em todos os seus sítios de ação (Haslett *et al.* 1997b). Além disso, devido seu efeito

sedativo, a talidomida pode ter contribuído para a não reversão das baixas ingestões de líquidos e de alimentos observadas em animais submetidos a mucosite intestinal por metotrexato, quando comparada à variação de consumo de água ou ração de ratos normais.

Adicionalmente, com o intuito de se estabelecer mais claramente o papel do TNF- α nesse modelo, buscou-se usar a tecnologia de DNA recombinante que permite deletar genes alvos de animais. O uso de animais geneticamente manipulados produz uma linhagem mutante com uma anormalidade conhecida como *Knockout*. Para determinar as funções que citocinas exercem *in vivo*, animais com mutações *Knockout* para esses mediadores têm sido gerados (Elson *et al.* 1995). Assim, usou-se o modelo de mucosite intestinal induzida por metotrexato adaptado em camundongos C57BL/6 *Knockout* para o receptor R1 (p55) de TNF- α (TNF-R1 $^{-/-}$), comparados aos animais normais (TNF-R1 $^{+/+}$).

Observou-se que o procedimento de *Knockout* para TNF-R1 nos camundongos, apesar de não alterar a mucosa de forma significativa ao nível de íleo, causou alterações significativas nas relações entre as alturas das vilosidades intestinais e profundidade das criptas ao nível de duodeno e jejuno. Isto demonstra que a ausência de atividade de TNF- α , por si só, causou alteração morfológica no duodeno e no jejuno, sugerindo que essa citocina exerça um papel importante, onde os níveis basais de sua produção parecem ser essenciais para a manutenção dos processos homeostáticos.

Quando a mucosite intestinal foi induzida por metotrexato, esta foi parcialmente reduzida em animais *Knockout* para o receptor R1 de TNF- α ao nível de jejuno e íleo, comparada aos camundongos *Knockout* sem mucosite (TNF-R1 $^{-/-}$) ou aos animais normais (TNF-R1 $^{+/+}$), mas estes, submetidos, igualmente, à mucosite intestinal. De fato, tais achados podem ser corroborados pelo estudo imunohistoquímico realizado em mucosas duodenais de ratos para a detecção de TNF- α . Tal procedimento evidenciou

a presença dessa citocina mesmo em animais normais, e que a administração de metotrexato causou um aumento das marcações de TNF- α nessas mucosas. Assim, pode-se sugerir que o TNF- α é um mediador importante na mucosite intestinal, e a sua indução em processos inflamatórios pode ser um fator amplificador das lesões vistas nesse modelo.

Em suma, os dados apresentados nesse estudo sugerem o envolvimento primário de citocinas, como o TNF- α na patogênese das mucosites induzidas por antineoplásicos, dado que a inibição desse mediador reduziu o dano às mucosas submetidas às mucosites intestinal e oral, enquanto que, às prostaglandinas, lhes seria reservado um papel dependente de sua concentração. Entretanto, deve ser considerado que outros mediadores químicos podem, também, exercer seus efeitos pró-inflamatórios, corroborando assim, o papel da inflamação nesse processo multifatorial.

Embora os modelos aqui apresentados não reproduzirem com exatidão as doenças em humanos, os mesmos foram extremamente valiosos em permitir pesquisar a complexidade dessas alterações, como evidenciado pela evolução observada até o presente momento. Nesse sentido, é razoável sugerir a possibilidade de protocolos clínicos prospectivos e randomizados, com o intuito de se estabelecer a eficácia de substâncias como celecoxib, pentoxifilina e talidomida na terapêutica das mucosites oral ou intestinal induzidas por agentes quimioterápicos em humanos.

VI. CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

- Os modelos de mucosites oral e intestinal induzidas por agentes antineoplásicos utilizados nesse estudo foram facilmente reproduzíveis e capazes de mimetizar os principais aspectos das mucosites em humanos;
- Pentoxifilina e talidomida apresentaram efeitos protetores significativos nas mucosites oral e intestinal, possivelmente via inibição de TNF- α , visto que esta citocina constitui-se em um alvo comum para ambas as drogas;
- A redução da relação vilos/criptas dos animais induzidas pela ausência de receptores-1 para TNF- α , associada à demonstração da presença de TNF- α por marcação imunohistoquímica em mucosa intestinal de ratos normais, demonstraram que níveis basais de TNF- α são essenciais para a manutenção da homeostasia das mucosas intestinais;
- Celecoxib apresentou efeito protetor parcial, visto que doses menores causaram maior proteção, sugerindo que as prostaglandinas possuem um papel dependente de sua concentração nas mucosites oral e intestinal;
- Pentoxifilina, talidomida e celecoxib apresentaram importantes efeitos protetores dessas lesões, podendo tornar-se possíveis candidatos a estudos experimentais complementares e a protocolos clínicos prospectivos e randomizados, no sentido de se estabelecer a eficácia dessas substâncias na terapêutica das mucosites induzidas por antineoplásicos em humanos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEGRA, C.J., GREM, J. L. Em: De Vita. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5th ed., chap. 6, p. 432-452, Lippincott-Raven, 1997.
- BAI, M.X., JIANG, Z.M., LIU, Y.W., WANG, W.T., LI, D.M., WILMORE, D.W. Effects of alanyl-glutamine on gut barrier function. Nutrition, v. 12(11-12), p. 793-796, 1996.
- BAMBA, H., OTA, S., KATO, A., MATSUZAKI, F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs may delay the repair of gastric mucosa by suppressing prostaglandin-mediated increase of hepatocyte growth factor production. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 245, p. 567-571, 1998.
- BANAN, A., McCORMACK, S. A., JOHNSON, L. R., Polyamines are required for microtubule formation during gastric mucosal healing. Am. J. Physiol., v. 274, p. G879-G885, 1998.
- BARBOZA JR, M. S., SILVA, T. M. J., GUERRANT, R. L., LIMA, A. A. M., Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 32, p. 1499-1504, 1999.
- BARNETT, K. BELL, C. J., McNIGHT, W., DICAY, M., SHARKEY, K. A., WALLACE, J. L., Role of cyclooxygenase-2 in modulating gastric acid secretion in the normal and inflamed rat stomach. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., v. 579, p. G1292-G1297, 2000.
- BAUER KS, DIXON SC, FIGG WD. Inhibition of angiogenesis by thalidomide requires metabolic activation, which is species-dependent. Biochem Pharmacol., v. 1;55(11), p. 1827-1834, 1998.
- BECK, P. L., PODOLSKY, D. K., Growth factors in inflammatory bowel disease. Inflamm. Bowel, v. 5, p. 44-60, 1999.
- BEICHE, F., SCHUERER, S., BRUNE, K., GEISLINGER, G., GOPPELT-STREBE, M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. FEBS Lett., v. 390 (2), p. 165-169, 1996.
- BERGER, A. M., KILROY, T. J., Adverse Effects of Treatment: Oral complications. Em: Em: De Vita. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 5th edition, chap. 53 (2), p. 2714-2725, Lippincott-Raven, 1997.
- BEUTLER, B., CERAMI, A., Tumor necrosis, cachectin, shock and inflammation. Ann. Ver. Biochem., 57: p. 505, 1988.

- BHATTI, M.A., HODGSON, H.J. Animal models of inflammatory bowel disease. *Int J Exp Pathol.*, v. 76(5), p.309-315, 1995.
- BIJLSMA, P. B., PEETERS, R. A., GROOT, J. A., DEKKER, P. R., TAMINIAU, J. A. J. M., VAN DER MEER, R.. Differential in vivo and in vitro intestinal permeability to lactulose and mannitol in animals and humans: a hypothesis. *Gastroenterology*, v. 108(3), p. 687-696, 1995.
- BLEYER, W. A. The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer*, v. 41(1), p. 36-51, 1978.
- BONE, R. C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann. Intern. Med.*, v. 125, p. 680-687, 1996.
- 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, p.206-209, 1982.
- CARNEIRO-FILHO, B. A., LIMA, I.P., ARAÚJO, D.H., CAVALCANTE, M. C., CARVALHO, G. H., BRITO, G. A., LIMA, V., MONTEIRO, S.M., SANTOS, F.N., RIBEIRO, R. A., LIMA, A. A. M. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucosites. *Dig. Dis. Sci.*, v. 49 (1), p.65-72, 2004.
- CALABRESE, L., FLEISCHER, A. B., Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am. J. Med.*, v. 108, p. 487-495, 2000.
- CALABRESI, P., CHABNER, B. A. Quimioterapia das Doenças Neoplásicas. Em: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., *Goodman & Gilman's – As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 9^a. ed., seção IX, p. 1035-1039, McGraw-Hill Editora, Interamericana, Brasil, 2003.
- CARVALHO, W. A. Analgésicos, Antipiréticos e antiinflamatórios. Em: P. Silva. *Farmacologia*, 6^a edição, cap. 46, p. 431-455, Editora Guanabara Koogan, 2002.
- CHABNER, B. A., RYAN, D.P., PAZ-ARES, L., CALABRESI, P., Agentes Antineoplásicos. Em: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., *Goodman & Gilman's – As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 10^a. ed., cap. 52, p. 1040-1093, McGraw-Hill Editora, Interamericana, Brasil, 2003.
- CHANDRASEKHARAN, N.V., DAI, H., ROOS, K. L. T., EVANSON, N. K., TOMSIK, J., ELTON, T. S., SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs:

- cloning, structure, and expression. *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99 (21), p. 13926-13931, 2002.
- CLEMETT, D., GOA, K. L. Celecoxib – review of its use in osteoarthritis, rheumatic arthritis and acute pain. *Drugs*, v.59 (4), p. 957-980, 2000.
- COOPER, G. M., *Cancer. Em: COOPER, G. M., The Cell – a molecular approach*, 2nd edition, chap. 15, p. 609-650, ASM Press-Sinauer, 2000.
- DANNHARDT, G., KIEFER, W., KRÄMER, G., MAEHRLEIN, S., NOWE, U., FIEBICH, B. The pyrrole moiety as a template for COX-1/COX-2 inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 35, p. 499-510, 2000.
- DE LONG, R. U. A quantitative ultrastructural study of motor and sensory lumbosacral nerve roots in the thalidomide-treated rabbit fetus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, v. 49, p. 564-581, 1990.
- D'HELLEN COURT, C. L., DIAW, L., CORNILLET, P., GUENOUNOU, M., Differential regulation of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- β and IL-10 by pentoxifylline. *Int. J. Immunopharmac.*, v. 18 (12), p. 739-748, 1996.
- DI GIROLAMO, N., VISVANATHAN, K., LOYD, A., WAKEFIELD, D. Expression of TNF- α by human plasma cells in chronic inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 61, p. 667-678, 1997.
- DOHERTY, G. M., JENSEN, J. C., ALEXANDER, H. R., BURESH, C. M., NORTON, J. A., Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery (St. Louis)*, v. 110, p. 192, 1991.
- DONEHOWER, R. C., ABELOFF, M. D., PERRY, M. C., *Chemotherapy. Em: ABELOFF, M. D., ARMITAGE, J. O., LICHTER, A. S., NIEDERHUBER, J. E., Clinical Oncology*, cap. 12, p. 201-218, Churchill Livingstone Inc, New York, NY, 1995.
- DUNZENDORFER, S., SCHRATZBERGER, P., REINISCH, N., KÄHLER, C. M., WIEDERMANN, C.J. Effects of thalidomide on neutrophil respiratory burst, chemotaxis, and transmigration of cytokine- and endotoxin-activated endothelium. *Arch. Pharmacol.*, v. 356, p. 529-535, 1997.
- DUPERON, D. The effect of topical leukovorin on gingiva of Long Evans rats undergoing methotrexate therapy. *J. Oral Med.*, v. 33, p. 12-16, 1978.
- ELSON, C. O., SARTOR, R. B., TENNYSON, G. S., RIDDEL, R. H., *Experimental Models of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol.*, v. 109, p. 1344-1367, 1995.
- EMERY, P., ZEIDLER, H., KVIEN, T. K., GUSLANDI, M., NAUDIN, R., STEAD, H., VERBURG, K. M., ISAKSON, P. C., HUBBARD, R. C., GEIS,

- G. S. Celecoxib versus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomized double-blind comparison. *Lancet*, v. 354, p. 2106-2111, 1999.
- ERIKSSON T., BJÖRMAN, S., HÖGLUND, P. Clinical pharmacology of thalidomide. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 57, p. 365-376, 2001.
- ETING, L. S., BODEY, G. P., KEEFE, B. H., Septicemia e shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. *Clin. Infect. Dis.*, v. 14, p. 1201-1207, 1992.
- FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, v. 115, p. 182-205, 1998.
- FLEMING SC, KAPEMBWA MS, LAKER MF, LEVIN GE, GRIFFIN GE. Rapid and simultaneous determination of lactulose and mannitol in urine, by HPLC with pulsed amperometric detection, for use in studies of intestinal permeability. *Clin Chem.*, v. 36(5), p. 797-799, 1990.
- GARDINER, K. R., ANDERSON, N. H., ROWLANDS, B. J., BARBUL, A. Colitis and colonic mucosal barrier dysfunction. *Gut*, v. 37, p. 530 –535, 1995.
- GILROY, D.W., TOMLINSON, A., WILLOUGHBY, D.A. Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. *Inflamm. Res.*, v. 47, p. 79-85, 1998.
- GONZALEZ-AMARO R, PORTALES-PEREZ D, BARANDA L, REDONDO JM, MARTINEZ-MARTINEZ S, YANEZ-MO M, GARCIA-VICUNA R, CABANAS C, SANCHEZ-MADRID F. Pentoxifylline inhibits adhesion and activation of human T lymphocytes. *J. Immunol.*, v. 161(1), p. 65-72, 1998.
- HAMMERSCHMIDT, D.E., KOTASEK, D., McCARTHY, T., HUH, P-W., FREYBURGER, G., VERCELLOTTI, G. M. Pentoxifylline inhibits granulocyte and platelet function, including granulocyte priming by platelet activating factor. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 112, p. 254-263, 1988.
- HAN, D. S., LI, F., HOLT, L., CONNOLLY, K., HUBERT, M., MICELI, R., OKOYE, Z., SANTIAGO, G., WINDLE, K., WONG, E., SARTOR, R. B. Keratinocyte growth factor-2 (FGF-10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, v. 279, p. G1011-G1022, 2000.
- HASHIMOTO, Y. Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 10, p. 461-479, 2002.

- HASLETT, P., HEMPSTEAD, M., SEIDMAN, C., DIAKUN, J., VASQUEZ, D., FREEDMAN, V. H., KAPLAN, G. The metabolic and immunologic effects of short-term thalidomide treatment of patients infected with the human immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, v. 13, p. 1047-1054, 1997b.
- HERDCHMAN, H. R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1299, p.125-140, 1996.
- HERRSTEDT, J., Prevention and management of mucositis in patients with cancer. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 16., p. 161-163, 2000.
- HOWE, L. R., DANNENBERG, A. J., A role for cicloxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. *Semin. Oncol.*, v. 29 (11), p. 111-119, 2002.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. MINISTÉRIO DE SAÚDE. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil-2002. INCa-MS, 1996-2004.
- ITOH, T., SUZUKI, M., MITSUI, Y, Keratinocyte growth factor as a mitogen for primary culture of rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 192, p. 1011-1015, 1993.
- JACOBSON, J.M., GREENSPAN, J.S., SPRITZLER, J., KETTER, N., FAHEY, J.L., JACKSON, J.B., FOX, L., CHERNOFF, M., WU, A. W., MACPHAIL, L. A., VASQUEZ, G.J., WOHL, D.A. Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. *N. Engl. J. Med.*, v. 336, p. 1487-1493, 1997.
- JIMENEZ JL, PUNZON C, NAVARRO J, MUNOZ-FERNANDEZ MA, FRESNO M. Phosphodiesterase 4 inhibitors prevent cytokine secretion by T lymphocytes by inhibiting nuclear factor-kappaB and nuclear factor of activated T cells activation. *J Pharmacol Exp Ther.*, v. 299(2), p. 753-9, 2001.
- JOBIN, C., MORTEAU, O., HAN, D. S., SARTOR, R. B., Specific NF- κ B blockade selectively inhibits tumour necrosis factor- α -induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells. *Immunology*, v. 95, p. 537-543, 1998.
- KAGNOFF, M. F., ECKMANN, L., Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Invest.*, v. 100, p. 259-263, 1997.
- KAMEN, B. A., COLE, P. D., BERTINO, J. R., **Folate Antagonists** . Em: BAST JR., R. C., KUFEL, D. W., POLLOCK, R. E., WEICHSELBAUM, R.

- R., HOLLAND, J. F., FREI III, E., GANSLER, T. S., Cancer Medicine e5, cap. 46, NCBI, 5th edition, Ontario, CA, 2000.
- KEEFE, D. M. K., CUMMINS, A. G., DALE, B. M., KOTASEK, D., ROBB, T. A., SAGE, R. E., Effect of high-dose chemotherapy on intestinal permeability in humans. Clin. Sci., v. 92, p. 385-389, 1997.
- KEIFER JA, GUTTRIDGE DC, ASHBURNER BP, BALDWIN AS JR. Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. J Biol Chem., v. 22; 276(25), p. 22382-22387, 2001.
- KLAUSNER, J. D., FREEDMAN, V. H., KAPLAN, G., Thalidomide as an anti-TNF- α inhibitor: implications for clinical use. Clin. Immunol. Immunopathol., v. 81, p. 219-223, 1996.
- KLAUSNER, J. D., MAKONKAWKEYOON, S., AKARESEWI, P., NAKATA, K., KASINRERK, W., CORRAL, L. DEWAR, R. L. The effect of thalidomide: on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 and M. Tuberculosis infection. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., v. 11, p. 247-257, 1996.
- KLEBANOFF, S. J., VADAS, M. A., HARLAN, J. M., SPARKS, L.H., GAMBLE, J.R., AGOSTI, J.M., WALTERSDORPH, A.M. Stimulation of neutrophils by tumour necrosis factor. Journal of Immunology, 136: 4220, 1986.
- KNOX, J. J., PUODZIUNAS, A. L. V., FELD, R., Chemotherapy-induced Oral Mucositis. Drugs & Aging, 17 (4) 257-267, 2000.
- KOC, S., LEISENRING, W., FLOWERS, M. E. Thalidomide for treatment of patients with chronic graft-versus-host disease. Blood, v. 96 (12), p. 3995-3996.
- KOLIOS, G., PETOUMENOS, C., NAKOS, A. Mediators of inflammation: production and implication in inflammatory bowel disease. Hepato-Gastroenterol., v. 45, p. 1601-1609, 1998.
- KÖMHOFF, M., GRÖNE, H., KLEIN, H. J., SEYBERTH, H. W., NÜSING, R. M. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. Am. J. Physiol., v. 272, p. F460-F468, 1997.
- KOWALSKI, L. P., NISHIMOTO, I. N. Epidemiologia do câncer de boca. Em: PARISE JR., O., Câncer de Boca: aspectos básicos e terapêuticos. Cap.1, p. 3-11, Editora Savier, São Paulo, SP, 2000.

- KUNKEL, S. L., CHENSUE, S. W., PHAN, S. H. Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production. *J. Immunol.*, v. 136, p. 186-192, 1986.
- KUNZ W. N-Phthalyl glutaminsäure-imid. *Arzneimittelforschung.*, v. 6, p. 426-430, 1956
- KWOK, K., SCHUBERT, M. M., *Drogas antineoplásicas*. Em: YAGIELA, J. A., NEIDLE, E. A., DOWD, F., *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*, 4ª Edição, cap. 40, p. 533-548, Editora Guanabara-Koogan S. A., Rio de Janeiro, RJ, 2000.
- LACY, E. R., Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J. C. Gastroenterol*, suppl. 10, p. 72-77, 1988.
- LAINE, P. O., LINDQVIST, J. C., PYRHONEN, S. O., STRAND-PETTINEN, I. M., TEERENHOVI, L. M., MEURMAN, J. H., Oral infections as reasons for febrile episodes in lymphoma patients receiving cytostatic drugs. *Eur. J. Cancer Oral Oncol.*, v. 28 B, p. 103-107, 1992.
- LAKER MF, MENZIES IS. Increase in human intestinal permeability following ingestion of hypertonic solutions. *J Physiol.*, v. 265(3), p.881-894, 1977.
- LARRICK, J. W., KUNKEL, S. L., The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response. *Pharmaceutical Research*, 5(3): 129-139, 1988.
- LEFKOWITH, J. B., Cyclooxygenase-2 Specificity and its clinical implications. *Am. J. Med.*, v. 106 (5B), p. 43S-50S, 1999.
- LENZ, W. A short history of thalidomide embriyopathy. *Teratology*, v. 38, p. 203-215, 1988
- LIMA, V. Efeito de moduladores da produção de citocinas (clorpromazina, pentoxifilina, talidomida e dexametasona) na doença experimental induzida por corpo estranho em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 150 p., 1999.
- LIMA, V., VIDAL, F. D. P., ROCHA, F. A. C., BRITO, G. A. C., RIBEIRO, R. A. Effects of TNF-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on the alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J. Periodontol.*, v. 75 (1), p. 162-168, 2004.
- LONGO, W. E., ERICKSON, B., PANESAR, N., MAZUSKI, J. E., ROBINSON, S., KAMINSKI, D. L. The role of selective cyclooxygenase isoforms in human intestinal smooth muscle cell stimulated prostanoid formation and proliferation. *Mediators of inflammation*, v. 7, p. 373-380, 1998.

- LOPRINZI, C. L., GASTINEAU, D. A., FOOTE, R. L., Oral Complications. Em: ABELOFF, M. D., ARMITAGE, J. O., LICHTER, A. S., NIEDERHUBER, J. E., *Clinical Oncology*, cap. 43, p. 741-752, Churchill Livingstone Inc, New York, NY, 1995.
- MADI, K., ZALTMAN, C., TAKIYA, C. M., Arquitetura da Mucosa Intestinal e sua Plasticidade. Em: ELIA, C. C. S., SOUZA, H. S. P. *Imunologia da Mucosa Intestinal da bancada ao leito*, cap. 2, p. 11-39, Editora Atheneu, São Paulo, SP, Rio de Janeiro, RJ, Belo Horizonte, MG, 2001.
- MARQUES LJ, ZHENG L, POULAKIS N, GUZMAN J, COSTABEL U. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 159(2), p. 508-511, 1999.
- MASFERRER JL, ZWEIFEL BS, MANNING PT, HAUSER SD, LEAHY KM, SMITH WG, ISAKSON PC, SEIBERT K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 12;91(8), p. 3228-3232, 1994.
- McBRIDE, W. G. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet*, v. 2, p. 1358, 1961
- McCARTHY, G. M., AWDE, J. D., GHANDI, H., VINCENT, M., KOCHA, W. I., Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncology*, v. 34, p. 484-490, 1998.
- MCHUGH, S.M., RIFKIN, I.R., DEIGHTON, J., WILSON, A.B., LACHMANN, P.J., LOCKWOOD, C.M., EWAN, P.W. The immunosuppressive drug thalidomide induces T helper cell type 2 (Th2) and concomitantly inhibits Th1 cytokine production in mitogen- and antigen-stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 99, p.160-167, 1995.
- MICELI, R., HUBERT, M., SANTIAGO, G., YAO, D. L., COLEMAN, T. A., HUDDLESTON, K. A., CONNOLLY, K. Efficacy of keratinocyte growth factor-2 in dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 290, p. 464-471, 1999.
- MIFFLIN, R. C., SAADA, J. I., DI MARI, J. F., ADEGBOYEGA, P. A., VALENTICH, J. D., POWELL, D. W. Regulation of COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts: mechanisms of IL-1-mediated induction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v. 282, p. 824-834, 2002.
- MITCHELL JA, EVANS TW. Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm Res.*,v. 47 (2), p. S88-92, 1998.

- MITCHELL, J. A., AKARAREREENONT, P., THIEMERMANN, C., FLOWER, R. J., VANE, J. R., Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 11693-11697, 1994.
- MITCHELL, J. A., EVANS, T. W. Cyclooxygenase-2 as a therapeutic target. *Inflamm. Res.*, v. 47 (2), p. 88-92, 1998.
- MOLDAWER, L. L. Biology of proinflammatory cytokines and their antagonists. *Crit. Care Med.*, v. 22, p. S3-S7, 1994.
- MOLLER, D.R., WYSOCKA, M., GREENLEE, B.M., MA, X., WAHL, L., TRINCHIERE, G., KARP, C.L. Inhibition human interleukin-12 production by pentoxifylline. *Immunology*, v. 91, p. 197-203, 1997b.
- MOREIRA, A. L., SAMPAIO, E. P., ZMUIDZINAS, A., FRINDT, P., SMITH, K. A., KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor α by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.*, v. 177, p. 1675-1680, 1993.
- MOVAT, H.Z., CYBULSKY, M. I., COLDITZ, I. G., CHAN, M. K. W., DINARELLO, C. A. Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils. *Fed. Proc.*, v. 46, p. 97-104, 1987.
- NASCA, M.R., O'TOOLE, E.A., PALICHARIA, P., WEST, D.R., WOODLEYD.T. Thalidomide increases human keratinocyte migration and proliferation. *J. Invest. Dermatol.*, v. 113, p. 720-724, 1999.
- NELSON, K. A., WALSH, D., SHEEHAN, F. A. The cancer anorexia-cachexia syndrome. *J. Clin. Oncol.*, v. 12 (1), p. 213-225, 1994.
- NEUNER P, KLOSNER G, SCHAUER E, POURMOJIB M, MACHEINER W, GRUNWALD C, KNOBLER R, SCHWARZ A, LUGER TA, SCHWARZ T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*, v. 83(2), p. 262-267, 1994.
- NIEDERBERGER E, TEGEDER I, VETTER G, SCHMIDTKO A, SCHMIDT H, EUCHENHOFER C, BRAUTIGAM L, GROSCH S, GEISLINGER G. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF-kappaB. *FASEB J.*, v. 15(9), p. 1622-1624, 2001.
- OTTO, J. C., SMITH, W. L., Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J. Lipid. Mediat. Cell Signal.*, v. 12, p. 139-156, 1995.
- PAI, R., SZABO, I. L., KAWANAKA, H., SOREGHAN, B. A., JONES, M. K., TARNAWSKI, A. S. Indomethacin inhibits endothelial cell proliferation by suppressing cell cycle proteins and PRB phosphorylation: a key to its

- antiangiogenic action? *Mol. Cell. Biol. Res. Comm.*, v. 4, p. 111-116, 2000.
- PARFENOVA, H., EIDSON, T. H., LEFFLER, C. W., Upregulation of COX-2 in cerebral microvascular endothelial cells by smooth muscle cell signals. *Am. J. Physiol.*, v. 273, p. C277-C288, 1997.
- PARKIN, J., COHEN, B. An overview of the immune system. *Immunology*, v. 357 (2), p. 1777-89, 2001.
- PAULSON SK, ZHANG JY, BREAU AP, HRIBAR JD, LIU NW, JESSEN SM, LAWAL YM, COGBURN JN, GRESK CJ, MARKOS CS, MAZIASZ TJ, SCHOENHARD GL, BURTON EG. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab. Dispos.*, v. 28(5), p. 514-521, 2000a.
- PAULSON SK, ZHANG JY, JESSEN SM, LAWAL Y, LIU NW, DUDKOWSKI CM, WANG YF, CHANG M, YANG D, FINDLAY JW, BERGE MA, MARKOS CS, BREAU AP, HRIBAR JD, YUAN J. Comparison of celecoxib metabolism and excretion in mouse, rabbit, dog, cynomolgus monkey and rhesus monkey. *Xenobiotica*, v. 30(7), p. 731-744, 2000b.
- PEARSON AD, EASTHAM EJ, LAKER MF, CRAFT AW, NELSON R. Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*, v. 3;285(6334), p. 20-21, 1982.
- PETERSON, D. E., D'AMBROSIO, J. A., Nonsurgical management of head and neck cancer patients. *Dent. Clin. North Am.*, v. 38, p. 425-445, 1994.
- PINEDO, H. M., PETERS, G. F. J., Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.*, 6: 1653-1664, 1988
- PIZZORNO, G., HANDSCHUMACHER, R. E., CHENG, Y-C., Pyrimidine and Purine Antimetabolites. Em: BAST JR., R. C., KUFER, D. W., POLLOCK, R. E., WEICHELBAUM, R. R., HOLLAND, J. F., FREI III, E., GANSLER, T. S., *Cancer Medicine* e5, cap. 47, NCBI, 5th edition, Ontario, CA, 2000.
- PLEVOVÁ, P. Prevention and treatment of chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: a review. *Oral oncol.*, v. 35, p. 453-470, 1999.
- PRYHUBER, G. S., KHALAK, R., ZHAO, Q. Regulation of surfactant proteins A and B by TNF- α and phorbol ester independent of NF-kB. *AJP-Lung Cel. Mol. Physiol.*, v. 274, p. 289-295, 1998.
- PUGH-HUMPHREYS, R. G. P., THOMSON, A. W., Cytokines and their receptors as potential therapeutic targets. In: THOMSON, A. W., *The Cytokine Handbook*, Academic press limited, 2nd ed., chap. 26 p. 525-566, 1994.

- RAINES, E. W., DOWER, S. K., ROSS, R., Interleukin mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF- AA. *Science*, v. 243, p. 393-396, 1989.
- REYNOLDS, H. Pentoxifylline-more evidence that it improves host defenses during sepsis. *Crit. Care. Med.*, v. 27, p. 681-683, 1999.
- RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 391, p. 97-103, 2000.
- RICHES, D., Signalling heterogeneity as a contributing factor in macrophage functional diversity. *Semin. Cell. Biol.*, 6: 377-384, 1995.
- ROBERT II, L. J., MORROW, D. Analgésico-antipiréticos e agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. Em: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., Goodman & Gilman's – As Bases Farmacológicas da Terapêutica, 10^a ed., McGraw-Hill Editora, Interamericana, Brasil, cap. 27, p. 517-550, 2003.
- RUBENSTEIN, E. B. Evaluating cost-effectiveness in outpatient management of medical complications in cancer patients. *Curr. Opin. Oncol.*, v. 10, p. 297-301, 1998. RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., Quimioterapia do Câncer. Em: Farmacologia, 4^a Edição, cap. 42, p. 557-575, Editora Guanabara-Koogan S. A., Rio de Janeiro, RJ, 2001.
- RUTH, J., SCHMIDT, E., VOGEL, F., KLAR, E. Indomethacin-induced disturbances in villous microcirculation in the rat ileum. *Microvasc. Res.*, v. 58, p. 137-143, 1999.
- SAMPAIO EP, MORAES MO, NERY JA, SANTOS AR, MATOS HC, SARNO EN. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin. Exp. Immunol.*, v. 111(2), p. 300-308, 1998.
- SAMPAIO, E.P., KAPLAN, G., MIRANDA, A., NERY, J. A. C., MIGUEL, C. P., VIANA, S. M., SARNO, E. N. The influence of thalidomide on the clinical and immunological manifestations of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.*, v. 168, p. 408-414, 1993.
- SAMPAIO, E.P., SARNO, E. N., GALILLY, R., COHN, Z. A., KAPLAN, G., Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor α production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.*, v. 173, p. 699-703, 1991.
- SARTOR K. MR imaging of the brain: tumors. *Eur Radiol.*, v. 9(6), p. 1047-1054, 1999.

- SCHANDENÉ, L., VANDENBUSSCHE, P., CRUSIAUX, A., ALÈGRE, M. L., ABRAMOWICZ, D., DUPONT, E., CONTENT, J., GOLDMAN, M., Differential effects of pentoxifylline on the production of tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology*, 76: 30-40, 1992.
- SCHMIDT-CHOUDHURY, A., FURUTA, G. T., LAVIGNE, J. A., GALLI, S. J., WERSHIL, B. K., The regulation of tumor necrosis factor- α production in murine mast cells: Pentoxifylline or dexamethasone inhibits Ig-E-dependent production of TNF- α by distinct mechanisms. *Cell. Immunol.*, 171 (184): 140-146, 1996.
- SCHNITZER, T. Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitors: are they safe? *Am. J. Med.*, v. 110 (1A), p. 46S-49S, 2001.
- SCHUBERT, M. M., EPSTEIN, J. B., PETERSON, D. E. Complicações Orais do Tratamento do Câncer. Em: YAGIELA, J. A., NEIDLE, E. A., DOWD, F., *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*, 4ª Edição, cap. 40, p. 533-548, Editora Guanabara-Koogan S. A., Rio de Janeiro, RJ, 2000.
- SHEKIN J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin. Pharmacol.*, v. 6, p. 303-306, 1965.
- SHKLAR, G. The effect of 4-amino-N 10-methyl-pteroylglutamic acid on oral mucosa of experimental animals. *J. Oral Ther.*, v. 4, p. 374-377, 1968.
- SINICROPE, F. A., LEVIN, B. Complications of Cancer and its treatment: Gastrointestinal Complications. Em: BAST JR., R. C., KUFEL, D. W., POLLOCK, R. E., WEICHSELBAUM, R. R., HOLLAND, J. F., FREI III, E., GANSLER, T. S., *Cancer Medicine e5*, cap. 152, NCBI, 5th edition, Ontario, CA, 2000.
- SMITH, C. J., ZHANG, Y., KOBOLDT, C. M., MUHAMMAD, J., ZWEIFEL, B. S., SHAFFER, A., TALLEY, J. J., MAASFERRER, J. L., SEIBERT, K., ISAKSON, P. C. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 13313-13318, 1998.
- SONIS, S.T., TRACEY, C., SHKLAR, G., JENSON, J., FLORINE, D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 437-443.
- SONIS, A. L., SONIS, S. T., Oral complications of cancer chemotherapy in pediatric patients. *J. Pedod.*, v. 3, p. 122-128, 1979.
- SONIS, S. T., LINDQUIST, L., VAN VUGT, A., STEWART, A., STAM, K., QU, G-Y., IWATA, K. K., HALEY, J. D., Prevention of chemotherapy-

- induced ulcerative mucositis by transforming growth factor β 3. *Cancer Res.*, v. 54, p. 1135-1138, 1994.
- SONIS, S. T., SONIS, A. L., LIEBERMAN, A., Oral complications in patients receiving treatment for malignancies other than head and neck. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 97, p. 468-472, 1978.
- SONIS, S., CLARK, J., Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. *Oncology*, v. 5, p. 6-10, 1991.
- SONIS, S., KOPLOWSKY, A., MITUS, J., ROSENTHAL, D., BRAND, M., Relationship of chemotherapy-induced mucositis and myelosuppression in hamsters. *Oral. Oncol. Eur. J. Cancer*, v. 28 B, p. 43., 1992.
- SONIS, S., MUSKA, A., O'BRIEN, J., VAN VUGT, A., LANGER-SAFER, P., KEITH, J. Alterations in frequency, severity and duration of chemotherapy-induced mucositis in hamsters by interleukin-11. *Oral Oncol. Eur. J. Cancer*, v. 31B, n. 4, p. 261-266, 1995.
- SONIS, S. T. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol.*, v.34, p. 39-43, 1998.
- SONIS, S.T., *Complications of Cancer and its treatment: Oral Complications.* Em: BAST JR., R. C., KUFEL, D. W., POLLOCK, R. E., WEICHSELBAUM, R. R., HOLLAND, J. F., FREI III, E., GANSLER, T. S., *Cancer Medicine* e5, cap. 153, NCBI, 5th edition, Ontario, CA, 2000.
- SORLI CH, ZHANG HJ, ARMSTRONG MB, RAJOTTE RV, MACLOUF J, ROBERTSON RP. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 95(4), p. 1788-1793. 1998.
- SORLI, C. H., ZHANG, H. J., ARMSTRONG, M. B., RAJOTTE, R. V., MACLOUF, J., ROBERTSON, R. P. Basal expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor-interleukin 6 are dominant and coordinately regulated by interleukin 1 in the pancreatic islet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 1788-1793, 1998.
- SPIJKERVET, F. K. L., SONIS, S. T., New frontiers in the management of chemotherapy-induced mucositis. *Cur. Opin. Oncol.*, v. 10 (1), p. S23-S27, 1998.
- STURM, A., SUDERMANN, T., SCHULTE, K-M., GOEBELL, H., DIGNASS, A. U., Modulation of intestinal epithelial wound healing in vitro and in vivo by lysophosphatidic acid. *Gastroenterology*, v. 117, p. 368-377, 1999.

- SULLIVAN, G.W., CARPER, H.T., NOVICK, W.J. JR, MANDELL, G.L.
Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect. Immun.*, v. 56(7), p.1722-1729, 1988.
- SULLIVAN, G.W., PATSELAS, T.N., REDICK, J.A., MANDELL, G.L.
Enhancement of chemotaxis and protection of mice from infection. *Trans Assoc Am Physicians*, v. 97, p. 337-345, 1984.
- SZABO S, TRIER JS, BROWN A, SCHNOOR J, HOMAN HD, BRADFORD JC.
A quantitative method for assessing the extent of experimental gastric erosions and ulcers. *J Pharmacol Methods.*, v. 13, p. 59-66, 1985.
- TESSNER, T. G., COHN, S. M., SCHOEMANN, S., STENSON, W. F.
Prostaglandins prevent decreased epithelial cell proliferation associated with dextran sodium sulfate injury in mice. *Gastroenterology*, v. 115, p. 874-882, 1998.
- THANHAUSER A, REILING N, BOHLE A, TOELLNER KM, DUCHROW M, SCHEEL D, SCHLUTER C, ERNST M, FLAD HD, ULMER AJ.
Pentoxifylline: a potent inhibitor of IL-2 and IFN-gamma biosynthesis and BCG-induced cytotoxicity. *Immunology*, v. 80(1), p. 151-156, 1993.
- TOOMEY, D., REDMOND, H. P., BOUCHIER-HAYES, D. Mechanisms mediating cancer cachexia. *Cancer*, v. 76, p. 2418-2426, 1995.
- TRUMMEL, C. L. Drogas antiinflamatórias. Em: YAGIELA, J. A., NEIDLE, E. A., DOWD, F. J., *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*. 4^a. Edição, cap. 22, p. 281-301. Editora Guanabara-Koogan S. A., Rio de Janeiro, RJ, 2000.
- TSENG S. PAK, G., WASHENIK, K., POMERANZ, M. K., SHUPACK, J. L.
Rediscovering thalidomide: A review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 35, p.- 969-979, 1996.
- TSUJIMOTO, K. J., YOKOTA, S., VILČEK, J., WEISSMANN, G., Tumour necrosis factor provokes superoxide anion generation from neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137: 1094, 1986.
- VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 38, p. 97-120, 1998.
- VIGANO, T., HABIB, A., HERNANDEZ, A., BONASSI, A., BORASCHI, D., LEBRET, M., CASSINA, E., MACLOUF, J., SALA, A., FOLCO, G.
Cyclooxygenase-2 and synthesis of PGE₂ in human bronchial smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, v. 155, p. 864-868, 1997.

- VILČEK, J.; LE, J., Immunology of cytokines: an introduction. In: THOMSON, A. W., The Cytokine Handbook, Academic press limited, 2nd ed., chap. 1 p. 1-19, 1994.
- WAGNER, J. G., ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.*, v. 52, p. 349-374, 2000.
- WAHL, S. M., HUNT, D. A., WAKEFIELD, L. M., McCARTENEY-FRANCIS, W., WAHL, L. M., ROBERTS, A. B., SPORN, M. B., Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 5788-5792, 1987.
- WALLACE, J. L., McKNIGHT, W., MIYASAKA, M., TAMATANI, T., PAULSON, J., ANDERSON, D. C., GRANGER, D. N., KUBES, P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. *Am. J. Physiol.*, v. 265, p. G993-G998, 1993.
- WARD, A., CLISSOLD, S. P., Pentoxifylline: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs*, 34 (1): 50-97, 1987.
- WILKES, J. D. Prevention and treatment of oral mucositis following cancer chemotherapy. *Semin. Oncol.*, v. 25, p. 538-551, 1998.
- WILLOUGHBY, D.A., MOORE, A.R., COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*; v. 3555 (9204), p. 646-648, 2000.
- WILSON, A. J., GIBSON, P. R., Epithelial migration in the colon filling in the gaps. *Clin. Sci. (Colch)*, v. 93, p. 97-108, 1997.
- WOO, P. C. Y., NG, W. F., LEUNG, H. C. H., TSOI, H. W., YUEN, K. Y., Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. *Pharmacol. Res.*, v. 41, p. 527-532, 2000.
- WOO, S. B., SONIS, T., MONOPOLI, M. M., SONIS, A. L. A longitudinal study of oral ulcerative mucositis in bone marrow transplant recipients. *Cancer*, v. 72, p. 1612-1617, 1993.
- YANG, K. D., CHUEN, H-L., SHAIU, M-F., Pentoxifylline augments but does not antagonize TNF- α -mediated neuroblastoma cell differentiation: modulation of calcium mobilization but not cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 211 (3), p. 1006-1014, 1995.
- ZIMMERMANN, K. C., SARBIA, M., SCHTÖR, K., WEBER, A. A. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol. Pharmacol*, v. 54 (3), p. 536-540, 1998.