



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Aline Almeida Figueiredo

**“Efeito do anticorpo anti-TNF- α , infliximabe, sobre a mucosite intestinal
experimental induzida por Irinotecano”**

Fortaleza – CE

2011

ALINE ALMEIDA FIGUEIREDO

**EFEITO DO ANTICORPO ANTI-TNF- α , INFLIXIMABE, SOBRE A
MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR
IRINOTECANO.**

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

Orientador (a):

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

FORTALEZA-CE

2011

Ao meu filho Felipe, que me mostrou o verdadeiro amor e que me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, protegendo, guiando e me orientando no maior projeto, a vida.

Aos meus pais, Eugênia e Edízio, que são as pessoas que mais acreditam em mim e torcem pela minha felicidade.

Ao meu professor e orientador, Professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, por ter sido a minha inspiração no apreço à Farmacologia desde a graduação e por ter tido persistência e paciência no decorrer do meu curso de mestrado.

Ao amigo e co-orientador, Professor Roberto César Pereira Lima Júnior, grande entusiasta do ensino e da pesquisa, pela fundamental e indispensável ajuda durante toda a realização deste trabalho e por me oferecer injeções de ânimo sempre que necessário.

À querida Deysi Viviana Tenazoa Wong, que me auxiliou muito na execução de vários ensaios e com quem dividi inúmeros momentos de dúvidas científicas e maternais.

Ao Rodolfo Borsaro, companheiro de vida e de profissão, por ter assumido minhas funções profissionais e domésticas durante a fase mais árdua desse trabalho, por estar ao meu lado e por dividir comigo a criação do “nosso pequenininho”.

Aos meus irmãos Marcelo, Luciana, Leandro e Natália, parte fundamental da minha vida, por estarem sempre presentes, por dividirem comigo as alegrias e as tristezas. Minha vida não seria a mesma sem vocês.

À Professora Gerly Anne de Castro Brito, pela presteza com que sempre me atendeu nas solicitações de análises histopatológicas.

Ao colega e amigo, Professor Marcos Rabelo de Freitas, pela competência com que exerce sua profissão ser fonte de inspiração para a minha prática clínica e cirúrgica e por ter dado o pontapé para o meu ingresso na pós-graduação.

À Karoline Saboia Aragão, pelas discussões empolgadas que muito auxiliaram na confecção deste trabalho.

Ao amigo e colega de mestrado, Sérgio Tadeu Almeida Pereira, parceiro de estudos e de inúmeros experimentos, meu sincero agradecimento pelo valioso auxílio durante esses anos de pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica Juliana Bastos Michiles, Lucas Pessoa Mineiro Apolônio e Caio Abner Vitorino Gonçalves Leite, pela amizade, dedicação e tempo despendido nesta e em outras pesquisas.

À técnica Maria Silvandira França Pinheiro pelo indescritível auxílio ao longo desses anos de LAFICA e pelo profissionalismo e dedicação com que exerce sua função.

Às secretárias da pós-graduação Magda Maria Gomes Fontenele e Maria Luciene Vieira de Oliveira, pela atenção com que sempre me atenderam e por resolver toda a parte burocrática do meu curso de mestrado.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.” (Mahatma Gandhi)

RESUMO

EFEITO DO ANTICORPO ANTI-TNF- α , INFLIXIMABE, SOBRE A MUCOSITE INTESTINAL EXPERIMENTAL INDUZIDA POR IRINOTECANO. Autor (a): Aline Almeida Figueiredo. Mestrado em Cirurgia. Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Defesa: 15 de julho de 2011. Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Introdução: A mucosite intestinal (MI) é um efeito colateral comum e limitante da quimioterapia com irinotecano. Estudos sugerem a participação de citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-18 na fisiopatologia da MI, além de demonstrar que inibidores não seletivos de citocinas, como pentoxifilina, atenuam a MI por irinotecano. O papel das citocinas está bem estabelecido no âmbito das doenças inflamatórias intestinais, inclusive com utilização de tratamentos visando inibir seletivamente componentes da casacata inflamatória, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-TNF α , infliximabe, que tem um efeito benéfico comprovado no tratamento da doença de Crohn, artrite reumatóide e espondilite anquilosante. Há escassos estudos na literatura de terapia alvo anti-citocinas inflamatórias no contexto da mucosite intestinal induzida por quimioterápico. **Objetivo:** Avaliar o papel do Infliximabe sobre as alterações inflamatórias e disfunção intestinal associados à MI induzida por Irinotecano. **Métodos:** Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupos (n=5-9) e tratados por 4 dias com salina (5 ml/kg, i.p) ou irinotecano (75 mg/kg, i.p) ou pré-tratados com infliximabe (5 mg/kg, e.v, dose única) 1 hora antes da primeira injeção de irinotecano. O peso e mortalidade foram avaliados diariamente. No 5º dia avaliou-se a diarreia por escores, o leucograma e, após sacrifício, coletou-se o duodeno para dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) e de IL-1 β , expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), análise de escores histopatológicos, morfometria e contratilidade *in vitro* ao carbacol. **Resultados:** Os animais tratados com irinotecano apresentaram mucosite intestinal, evidenciada por aumento significativo (p<0,05) nos escores de diarreia, diminuição do comprimento e área do vilo, aumento da atividade de MPO, aumento no nível tecidual de IL-1 β e de expressão de iNOS e hipercontratilidade da musculatura lisa duodenal, além de terem apresentado leucopenia, quando comparado com o grupo tratado com salina. O grupo de animais que recebeu infliximabe previamente ao tratamento com irinotecano apresentou melhora significativa (p<0,05) nos parâmetros inflamatórios avaliados (atividade de MPO, nível tecidual de IL-1 β , expressão de iNOS), comparado com o grupo tratado apenas com irinotecano. Contudo, a perda ponderal, a mortalidade e a disfunção intestinal (diarreia e contratilidade intestinal *in vitro*) não foram afetadas pelo tratamento com infliximabe (p>0,05). **Conclusões:** Os resultados mostram o proeminente efeito antiinflamatório da terapia anti TNF- α com infliximabe na MI induzida por irinotecano. Tal droga, no entanto, não foi capaz de alterar a sobrevida e de proteger contra a disfunção na MI experimental por irinotecano. Adicionalmente, acentuou a leucopenia induzida pelo irinotecano, o que pode aumentar o risco de complicações infecciosas.

Palavras-chave: Irinotecano, mucosite, TNF- α , infliximabe, inflamação.

ABSTRACT

EFFECT OF ANTIBODY ANTI-TNF- α , INFlixIMAB, IN IRINOTECAN-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS IN MICE. Author: Aline Almeida Figueiredo. Post-graduation in Surgery. Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Defense: July 15th 2011. Advised by Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Introduction: Intestinal mucositis (IM) is a common limiting side effect of anticancer therapy with irinotecan. Previous studies have reported the involvement of cytokines, such as TNF- α , IL-1 β e IL-18 in the pathogenesis of irinotecan-induced IM, besides demonstrating that nonselective inhibitors of cytokines such as pentoxifylline, attenuate chemotherapy-induced IM. The role of cytokines is well established in the context of inflammatory bowel disease. It is used in clinical practice treatments that target inflammatory cascade components, for example, the anti-TNF monoclonal antibody, infliximab, which has a beneficial effect in the treatment of Crohn's disease, rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. There is a lack of information regarding the effect of selective cytokine target therapy on anticancer drug toxicity. **Aims:** To investigate the protective role of a selective TNF- α inhibitor, infliximab, on irinotecan-induced IM. **Methods:** C57BL/6 mice were divided into groups (n=5-9) and treated for 4 days with saline (5 mL/kg, i.p.) or irinotecan (75 mg/kg/4 days, i.p) or were given infliximab (5 mg/kg, e.v, single dose) 1 hour before the first irinotecan injection. Body weight and mortality were assessed daily. On the 5th day the diarrhea was evaluated using scores and the blood was collected for white blood cell count (WBC). After euthanasia, samples of duodenum was collected for myeloperoxidase assay, tissue IL-1 β dosage, western blot (WB) of the inducible nitric oxide synthase, morphometric analysis and *in vitro* evaluation of duodenal contractility. **Results:** Irinotecan induced IM demonstrated by the significant (p<0,05) increase in diarrhea, decrease in length and area of the villi increased MPO activity, increased IL-1 β dosage and expression of iNOS and intestinal smooth muscle over-contraction when compared with saline treated group. The group treated with irinotecan also presented leucopenia, when compared with control group. The group treated with infliximab previously to irinotecan showed a significant improvement of inflammatory parameters (MPO activity, IL-1 β , expression of iNOS), when compared with irinotecan-treated group. However, animal weight loss, mortality and gut dysfunction (diarrhea and intestinal contractility) were not affected by infliximab treatment (p>0,05). **Conclusion:** The results suggest for the first time the prominent anti-inflammatory effect of the target therapy anti-TNF- α with infliximab on irinotecan-induced IM. However, such treatment did not alter the survival and did not protect against intestinal dysfunction in irinotecan-induced IM. Additionally accentuated leukopenia induced by irinotecan, which can increase the risk of infections.

Keywords: Irinotecan, mucositis, TNF- α , infliximab, inflammation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1	CrITÉRIOS de graduaÇão de gravidade da diarreia	17
Figura 1	Metabolismo do irinotecano	20
Figura 2	Fechamento de fístula abdominal e perianal em pacientes tratados com 5mg/Kg de infliximabe.	23
Figura 3	RepresentaÇão dos graus de diarreia ps injeÇão do irinotecano	30
Figura 4	RepresentaÇão esquemática das medidas morfométricas	31
Figura 5	Esquema de avaliaÇão funcional intestinal <i>in vitro</i>	35
Figura 6	O infliximabe não altera a sobrevida dos animais no modelo de mucosite intestinal por irinotecano	38
Figura 7	O infliximabe não altera a curva ponderal dos animais no modelo de mucosite intestinal por Irinotecano	39
Figura 8	Fotomicrografia de duodeno de camundongo injetado com salina 0,9%, Irinotecano ou Infliximabe + irinotecano	41
Figura 9	Infliximabe não protege das alteraÇões histopatológicas induzidas pelo irinotecano	42
Figura 10	Infliximabe diminui o encurtamento do vilo em camundongos tratados com Irinotecano	43
Figura 11	Infliximabe não altera a área do vilo em camundongos tratados com Irinotecano	44
Figura 12	Irinotecano associado ou não ao Infliximabe não altera a profundidade da cripta	45
Figura 13	Infliximabe previne as alteraÇões sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com Irinotecano	46
Figura 14	Infliximabe inibe a atividade de mieloperoxidase no duodeno de camundongos tratados com irinotecano	48
Figura 15	Infliximabe atenua a expressão de óxido nítrico sintase induzida em animais tratados com Irinotecano	49
Figura 16	Infliximabe reduz o nível tecidual de IL-1β no duodeno	50

de camundongos tratados com irinotecano

- Figura 17** O Infiximabe não altera a disfunção contrátil duodenal *in vitro* induzida por irinotecano em camundongos 52
- Figura 18** O infiximabe não altera a intensidade da diarréia em camundongos tratados com Irinotecano 53
- Figura 19** O Infiximabe intensifica a leucopenia induzida pelo Irinotecano 55

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
c-fos	Proto-oncogene c-fos
c-jun	Proto-oncogene c-jun
C57BL/6	Camundongos da espécie C57BL/6
CE	Colinesterase
CCh	Carbacol
CPT-11	Irinotecano
H & E	hematoxilina e eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamonio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	Molécula de Adesão Intracelular-1
IFN- γ	Interferon- γ
IgG1	Imunoglobulina G1
IL-11	Interleucina-11
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1Ra	Antagonista do receptor da Interleucina-1
IL-18	Interleucina-18
IL-18bp	Proteína ligante da Interleucina-18
IL-33	Interleucina-33
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
e.v.	Endovenoso
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal

JNK	Quinase do N-terminal de C-Jun (família da MAPK)
KC	Quimiocina derivada do queratinócito
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAPK	Proteínas Quinase Ativadas por Mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ²	Milímetro quadrado
MMP-1	Matriz Metaloproteinase-1
MMP-3	Matriz Metaloproteinase-3
MMP-9	Matriz Metaloproteinase-9
MPO	Enzima mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PLA ₂	Fosfolipase A ₂

Pró-IL-1	Pró-interleucina-1
Pró-IL-18	Pró-interleucina-18
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotecina (metabólito ativo do irinotecano)
Th1	Linfócitos T auxiliares 1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TNFR 1	Receptor-1 do Fator de Necrose Tumoral
TNFR 2	Receptor-2 do Fator de Necrose Tumoral
UGT1A1	Uridina 5'-difosfato-glicuronosil-transferase
VCAM-1	Molécula de adesão de células vasculares-1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Mucosite por antineoplásicos	16
1.2 Irinotecano	18
1.3 TNF-α	21
1.4 Infliximabe	23
1.5 Justificativa e relevância	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAS E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais	27
3.3 Drogas	28
3.4 Indução da mucosite intestinal	28
3.5 Grupos experimentais	28
3.6 Avaliação de parâmetro hematológico	29
3.7 Avaliação do grau da diarreia apresentada	29
3.8 Análise histopatológica e Morfometria da mucosa intestinal	30
3.9 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)	31
3.10 Dosagem de citocina IL-1β	32
3.11 Avaliação da expressão de iNOS por Western Blotting	33
3.12 Avaliação dos parâmetros funcionais em tiras isoladas de intestino (estudo in vitro)	33
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS	37
5.1. Análise da curva ponderal e curva de sobrevida	37
5.2. Ação do Infliximabe nas alterações morfológicas duodenais induzidas pelo Irinotecano	40
5.3. Ação do Infliximabe sobre as alterações inflamatórias intestinais induzidas pelo Irinotecano	47
5.4. Ação do Infliximabe sobre os parâmetros funcionais da mucosite intestinal induzida por Irinotecano	51
5.5. Análise de parâmetro hematológico	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	66

8. REFERÊNCIAS	67
-----------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mucosite por antineoplásicos

Mucosite alimentar ou gastrointestinal é o termo clínico usado para descrever as alterações provocadas pela quimioterapia e radioterapia antineoplásicas sobre as mucosas, podendo acometer o trato alimentar de maneira global ou localizada (cavidade oral ou mucosa intestinal). Esta síndrome, a depender da gravidade, caracteriza-se por ulceração da mucosa do trato digestivo, podendo resultar em dor, disfagia, diarreia e disfunção, de acordo com o tecido afetado (SONIS *et al.*, 2004; SONIS e FAY, 2002; SCULLY, SONIS, DIZ, 2006).

15 a 40% dos pacientes em quimioterapia convencional apresentam algum tipo de mucosite, sendo que esse percentual chega a quase 100% com a utilização de quimioterapia em altas doses para transplante de medula óssea ou transplante de células tronco hematopoiéticas (LOGAN *et al.*, 2007)

A mucosite gastrointestinal sintomática, com necessidade de intervenções e risco de complicações (Grau 3-4) ocorre em cerca de 15% dos pacientes em quimioterapia com irinotecano. Ao associar-se radioterapia à quimioterapia com irinotecano, esse percentual chega a 30% e, em pacientes submetidos a tratamentos de tumores gastrointestinais, ocorre em até 39% dos casos (SONIS *et al.*, 2004).

A diarreia, o sintoma mais marcante na mucosite intestinal, é observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando se observa diarreia de grau 3-4 (**TABELA 1**) em até 25% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007).

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

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

e proliferação epitelial, evita a ocorrência da fase ulcerativa, a mais sintomática (SONIS, FAY, 2002).

TABELA 1 - Critérios de graduação de gravidade da diarreia

Grau 1	Aumento da frequência de evacuações, menos de 4 vezes ao dia
Grau 2	Aumento da frequência de evacuações, de 4 a 6 vezes ao dia Evacuações noturnas Sem interferência nas atividades diárias
Grau 3	Aumento da frequência de evacuações ≥ 7 vezes ao dia Necessidade de hidratação venosa Hospitalização Interferência nas atividades diárias
Grau 4	Evacuações ≥ 10 vezes ao dia Diarreia francamente sanguinolenta Risco à vida (ex. colapso hemodinâmico)

Fonte: National Cancer Institute

A *fase de iniciação* ocorre logo após a radiação ou quimioterapia. A lesão celular direta das células epiteliais basais ocorre simultaneamente com a geração de estresse oxidativo e liberação de espécies reativas de oxigênio (SONIS *et al.*, 2004).

A *resposta primária ao dano*, observada nas células e tecidos da submucosa, é caracterizada pela expressão de genes de resposta precoce, c-jun, c-fos e Erg I, e pela ativação de fatores de transcrição, como fator nuclear- κ B (NF- κ B) (SCULLY, SONIS, DIZ, 2006), que parece ser um dos mais importantes, tanto em relação à toxicidade, como à resistência do tumor à quimioterapia (SONIS, 2004). A ativação do NF- κ B pode resultar na *upregulation* de mais de 200 genes, muitos deles responsáveis pela indução de fatores de transcrição levando à síntese de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (SONIS, 2004). Adicionalmente, a destruição da fibronectina também ocorre nessa fase da mucosite, resultando na ativação de macrófagos e subsequente lesão tecidual, mediada pelas metaloproteinases e produção adicional de TNF- α . A

participação do TNF- α na patogênese da mucosite oral foi evidenciada por trabalho deste grupo de pesquisa que mostrou que a pentoxifilina e a talidomida, inibidores da síntese de TNF- α reduzem significativamente a lesão induzida por 5-FU em hamster (LIMA *et al.*, 2005).

As citocinas inflamatórias não apenas lesam o tecido, como promovem uma alça de *feedback* positivo amplificando a lesão primária iniciada por radiação ou quimioterapia, caracterizando a fase de *amplificação do sinal* (SONIS, 2004).

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

A *fase de cicatrização* é biologicamente dinâmica, com sinalização da matriz submucosa extracelular, estimulando a migração, diferenciação e proliferação do epitélio. Além disso, observam-se o retorno da microbiota normal e a recuperação do número de leucócitos (SONIS *et al.*, 2004). Pesquisadores do LAFICA (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer) demonstraram que a glutamina e seu derivado estável alanil-glutamina aceleram a recuperação da mucosa oral lesada pelo uso de 5-FU (LEITÃO *et al.*, 2007).

1.2 Irinotecano

O irinotecano (CPT-11), um inibidor da topoisomerase I, é uma droga antineoplásica ativa contra uma variedade de tumores, sendo utilizado principalmente e com muita eficiência no tratamento do câncer colorretal (CHESTER *et al.*, 2003; LANGER, 2004; PEREZ *et al.*, 2004; ROCHA-LIMA *et al.*, 2004).

A topoisomerase I é uma enzima que atua sobre a dupla fita de DNA relaxando a supertorção gerada durante a fase de transcrição e replicação do DNA (WANG, 1996) Devido ao tamanho do cromossomo eucariótico, a remoção da supertorção se faz necessária e é realizada através da introdução de quebras transitórias em uma das

cadeias da dupla fita de DNA, o que permite que a cadeia que foi quebrada gire em torno da fita complementar intacta e a supertorção conseqüentemente seja removida. Após o relaxamento, a ligação intermediária covalente entre a topoisomerase I e o DNA se desfaz, sendo a taxa de religação da fita clivada normalmente mais rápida que a taxa de clivagem (CHAMPOUX, 2001). Contudo, uma variedade de drogas tem capacidade, tanto *in vivo* como *in vitro*, de estabilização do intermediário covalente topoisomerase I-DNA, como, por exemplo, o topotecano e o irinotecano. A topoisomerase I é, portanto, o alvo molecular da ação desses agentes, sendo os efeitos citotóxicos, conseqüentemente, fase S específicos.

O irinotecano é um derivado semi-sintético da camptotecina, a qual foi primariamente isolada das cascas da árvore *Camptotheca acuminata*, comumente encontrada na China e Tibet. O irinotecano é uma pró-droga cuja metabolização hepática gera o composto ativo SN-38 (**FIGURA 1**). Os estudos bioquímicos e análises de citotoxicidade realizados *in vitro* em células tumorais humanas e de roedores indicam, de forma consistente, que o SN-38 é, pelo menos, 1000 vezes mais potente como um inibidor de topoisomerase I do que o irinotecano (TAKIMOTO, ARBUCK, 2001). O SN-38 é formado a partir do irinotecano por clivagem da ligação de carbamato entre a fração camptotecina e a cadeia lateral dipiperidina mediada por uma carboxilesterase (GUICHARD *et al.*, 1999).

Os principais efeitos colaterais relacionados ao tratamento com Irinotecano são neutropenia, mucosite e diarreia, que freqüentemente ocorrem simultaneamente. A diarreia é constituída de uma fase inicial, que ocorre até 24h após o tratamento com o antineoplásico, estando relacionada com uma estimulação colinérgica, o que permite o manejo profilático com atropina, e uma fase tardia, que aparece entre o segundo e o vigésimo primeiro dia após o início do tratamento, mas principalmente entre o sexto e o décimo dia após a administração da droga. A diarreia tardia é o principal efeito colateral dose-limitante do tratamento com irinotecano (GIBSON *et al.*, 2003; STRINGER *et al.*, 2009), podendo ser aquosa e em pequeno volume, uma ou duas vezes ao dia ou, nos casos mais intensos, em número superior a dez episódios por dia. Nos quadros mais dramáticos, pode haver necessidade de nutrição parenteral ou até intervenções cirúrgicas, no caso de perfuração intestinal ou hemorragia maciça (GIBSON, KEEFE, 2006). Ocorre de forma acentuada em cerca de 30% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007).

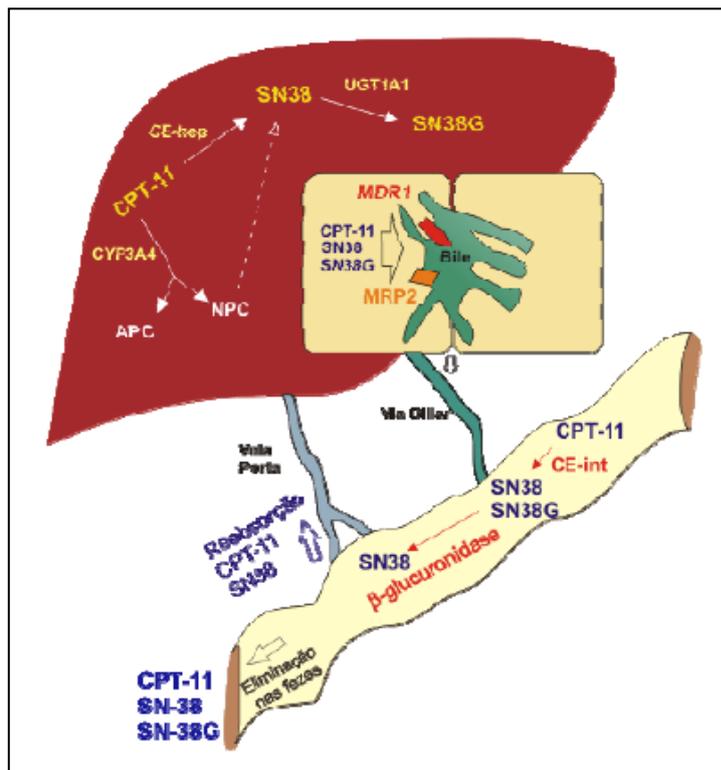


FIGURA 1 – Metabolismo do irinotecano

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

A ocorrência clínica de mucosite intestinal por irinotecano é variável entre pacientes. Tem sido sugerido que fatores como predisposição genética (IYER *et al.*, 1998) desempenham um importante papel na toxicidade desta droga. A glicuronidação do SN-38 exerce proteção contra a toxicidade por irinotecano. A UGT hepática e intestinal, particularmente a isoforma UGT1A1, estão envolvidas na glicuronidação do metabólito ativo (IYER *et al.*, 1998; TALLMAN *et al.*, 2007). Pacientes com baixa atividade da UGT1A1 podem ter uma predisposição genética para toxicidade por irinotecano (IYER *et al.*, 1998; TALLMAN *et al.*, 2007). Além disso, a microbiota intestinal pode também ter um importante papel na toxicidade por esta droga. Muitas bactérias residentes no intestino têm atividade β -glicuronidase e são capazes de converter o SN-38 glicuronizado de volta a seu metabólito ativo no intestino, potencializando a toxicidade e resultando em aumento de efeitos colaterais, como a diarreia (STRINGER *et al.*, 2007).

O mecanismo preciso através do qual o irinotecano induz mucosite intestinal e, conseqüentemente, diarreia é ainda desconhecido. Estudos anteriores investigaram a fase tardia da diarreia induzida por irinotecano e têm sugerido mecanismos diversos como citotoxicidade direta (IKUNO *et al.*, 1995) ou interferência direta com a microbiota intestinal através do aumento da atividade da enzima β -glicuronidase (TAKASUNA *et al.*, 1996). Nosso grupo destacou o papel das citocinas TNF- α , IL-1 β e KC no desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano, assim como a sua significativa atenuação pelo pré-tratamento com inibidores de TNF- α (talidomida) ou inibidores inespecíficos de citocinas, pentoxifilina (MELO *et al.*, 2008), além de ter evidenciado a participação da via Caspase-1, IL-18 e óxido nítrico na fisiopatologia da mucosite intestinal por irinotecano (LIMA-JR, 2008).

1.3 TNF- α

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma citocina que apresenta um amplo espectro de atividades, com receptores encontrados em virtualmente todos os tipos de células examinadas (SIEGEL *et al.*, 1995). É produzido por diversos tipos de células, como células T ativadas, monócitos e macrófagos ativados, células de Langerhans, queratinócitos, fibroblastos e astrócitos (ZIDI *et al.*, 2010).

São identificados dois receptores do TNF- α , tanto na forma solúvel quanto transmembrana, o TNFR1 (p55) e o TNFR2 (p75). TNFR1 é expresso em quase todo tipo celular, enquanto o TNRF2 se expressa principalmente em células hematológicas,

linfóides e endoteliais, tendo, este último, afinidade cinco vezes maior pelo TNF- α que o TNFR1 (ZIDI *et al.*, 2010). Os receptores parecem ser responsáveis por respostas distintas. O TNFR1 induz a maioria dos efeitos inflamatórios e citotóxicos do TNF- α , enquanto o TNFR2 parece desempenhar um papel mais destacado nas respostas proliferativas (ZIDI *et al.*, 2010).

O TNF- α tem atividades multifuncionais. Pode regular respostas imunes por causa da sua influência na produção de pró-timócitos, timócitos e células T e ativação de citotoxicidade de macrófagos e células NK (*natural killer*), sendo uma citocina essencial no controle de infecções por bactérias intracelulares, como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* e *Salmonella typhimurium* (PFEFFER, 2003). É também responsável pela adesão de leucócitos ao controlar expressão de moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), moléculas de adesão de células vasculares (VCAM-1) e E-selectina; pela quimioatração ao controlar a expressão de proteínas quimiotática de monócitos (MCP-1) e IL-8; pela degradação tecidual ao regular a expressão de proteínas de matriz metaloproteinase (MMP-1 e MMP-3) (ZIDI *et al.*, 2010). O TNF- α pode induzir a apoptose em várias células tumorais e em células T potencialmente auto-reativas. Neste último caso, uma produção exacerbada de TNF- α pode levar a um amplo espectro de doenças como osteoporose, indução de febre, sepse, neuropatias inflamatórias, doença do enxerto versus hospedeiro, resistência à insulina, sendo o principal mediador de diversas doenças autoimunes, como doença de Crohn e artrite reumatóide (ZIDI *et al.*, 2010). Tais atividades biológicas são mediadas pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8 via TNF- α .

As funções naturais do TNF- α incluem a modulação da resposta imune e inflamatória a uma variedade de condições autoimunes, malignas e infecciosas, como parte de um mecanismo regulatório complexo no qual várias outras citocinas participam (SIEGEL *et al.*, 1995). Enquanto o aumento da expressão do TNF- α em resposta à infecção ou outras injúrias pode ser considerado benéfico, a excessiva produção, usualmente por monócitos ou macrófagos ativados, pode ser considerada potencialmente lesiva (SIEGEL *et al.*, 1995).

Vários trabalhos têm demonstrado o papel fundamental do TNF- α na patogênese da mucosite intestinal (MELO *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2008; LOGAN *et al.*, 2009; FREITAS, 2007).

1.4 Infiximabe

Infiximabe é um anticorpo monoclonal IgG1 quimérico constituído de 75% de proteína humana e 25% de proteína de camundongo. A porção de camundongo contém o sítio de ligação para o TNF α , enquanto a porção humana é responsável pela função efetora. O infiximabe liga-se com alta afinidade e especificidade ao TNF alfa solúvel e TNF ligado à membrana, bloqueando as atividades biológicas da citocina (ZIDI *et al*, 2010).

É utilizado para o tratamento de diversas doenças autoimunes, como psoríase, doença de Crohn, espondilite anquilosante, artrite psoriática, artrite reumatóide, colite ulcerativa, granulomatose de Wegener e sarcoidose (ZIDI *et al*, 2010). Foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) pela primeira vez em 1998, para indução e manutenção de remissão na doença de Crohn ativa e tratamento da doença fistulizante (**FIGURA 2**), apresentando uma eficácia de 55% no completo fechamento de fístulas abdominais e perianais (PRESENT *et al.*, 1999). Foi o primeiro anticorpo monoclonal testado no tratamento da artrite reumatóide (ELLIOT *et al*, 1993).

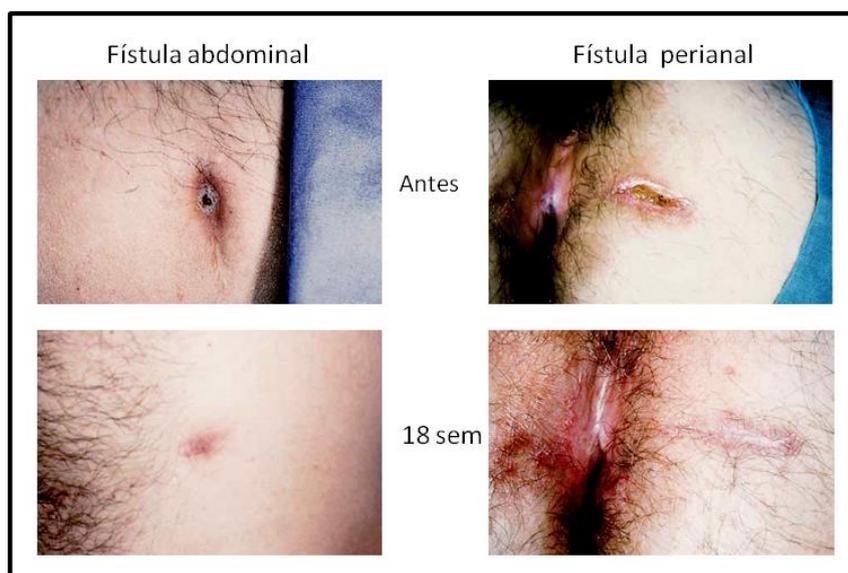


FIGURA 2 – Fechamento de fístula abdominal e perianal em pacientes tratados com 5mg/Kg de infiximabe.

Os pacientes foram tratados com infiximabe 5mg/Kg, i.v, nas semanas 0, 2 e 6. Extraído de Present *et al.*, 1999.

Apesar de, no manual do Remicade[®] (infiximabe), constar a afirmativa de que o chipanzé é a única espécie de laboratório que exhibe uma resposta farmacológica ao

infiximabe semelhante à de seres humanos (isto é, neutralização da atividade citotóxica do TNF- α), diversos trabalhos têm utilizado o Infiximabe em modelos murinos com excelentes resultados (ARAÚJO *et al.*, 2007; DEVECI *et al.*, 2008; WOLLIN *et al.*, 2009; FRIES *et al.*, 2008; XIONG *et al.*, 2009).

O Infiximabe leva à ativação do complemento, citotoxicidade mediada por anticorpo e apoptose de células T ativadas. Ainda, diminui a produção de citocinas Th1 na mucosa, como IL-1, IL-6 e IFN- γ , de moléculas de adesão como E-selectina e ICAM-1, de metaloproteinases como MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (SHEALY, VISVANATHAN, 2008; NAKADA *et al.*, 1998; SANDBORN, HANAUER, 1999). Além disso, infiximabe diminui fatores de coagulação e fibrinólise (HOMMES *et al.*, 1997) e fosfolipase A2 circulante (VAN DULLEMEN *et al.*, 1998).

Estudos do nosso grupo demonstraram que inibidores não seletivos de TNF- α como a talidomida e a pentoxifilina (um derivado de metilxantina que reduz a expressão de citocinas pró inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-8) foram eficazes em reduzir as lesões induzidas por irinotecano na mucosa intestinal, a atividade de MPO e níveis teciduais de TNF- α . A pentoxifilina (PTX) ainda inibiu significativamente os níveis teciduais de IL-1 β e KC (MELO *et al.*, 2008). Esses dados sugerem um importante papel do TNF- α na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Tendo em vista a relevante utilização clínica de inibidores seletivos de TNF- α na terapêutica de doenças inflamatórias intestinais, é lícito avaliar o papel de fármacos, como o infiximabe, sobre o desenvolvimento da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

1.5 Justificativa e relevância

A mucosite intestinal induzida por quimioterapia e por radioterapia é um efeito adverso freqüente que pode interferir na qualidade de vida e na eficácia do tratamento antineoplásico, com potencial risco para a vida dos pacientes. Muito se tem descoberto com relação aos mecanismos e mediadores envolvidos nos efeitos colaterais da quimioterapia do câncer. Nesse contexto, nosso grupo observou que o tratamento com irinotecano em camundongos causou uma significativa diarreia nos animais, com diminuição dos vilos intestinais e perda da arquitetura das criptas. Observamos ainda um aumento na concentração intestinal de TNF- α , IL-1 β e KC. Demonstramos,

também, o papel da via caspase-1/interleucina-18/óxido nítrico no desenvolvimento da mucosite intestinal. Verificamos também que a modulação desses mediadores inflamatórios é capaz de prevenir alterações nos aspectos morfológicos, inflamatórios e funcionais intestinais (desenvolvimento de diarreia e exacerbação da contratilidade *in vitro* de duodeno) induzidos por irinotecano, sugerindo que na patogênese da mucosite, e da diarreia a ela associada, a geração de óxido nítrico ativado por citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-18, por exemplo) contribui para a exacerbação da lesão. O papel das citocinas está bem estabelecido no âmbito das doenças inflamatórias intestinais, inclusive com estudos de novos tratamentos visando inibir seletivamente componentes da casacata inflamatória, como, por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-TNF α , infliximabe, que tem um efeito benéfico comprovado no tratamento da doença de Crohn. Até o momento, há poucos estudos de terapia alvo anti-citocinas inflamatórias no contexto da mucosite intestinal induzida por quimioterápico. Desta forma, justifica-se o estudo do infliximabe, um potente e seletivo inibidor de TNF- α , como possível ferramenta no tratamento da mucosite intestinal induzida por irinotecano.

Pergunta de partida:

A inibição seletiva da função de TNF- α com infliximabe seria capaz de modular o desenvolvimento da mucosite e disfunção intestinais associadas ao tratamento com irinotecano?

Hipótese:

Considerando o papel relevante de citocinas nos estágios de resposta primária ao dano quimioterápico e de amplificação de sinal, o Infliximabe é capaz de proteger a mucosa intestinal contra os danos inflamatórios e disfunção causados pelo Irinotecano.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar o papel do infliximabe, um inibidor seletivo do TNF- α , sobre as alterações inflamatórias e disfunção intestinal associados à mucosite induzida por irinotecano.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do infliximabe na sobrevida e curva ponderal associada à mucosite induzida por irinotecano.
- Avaliar a o efeito do infliximabe sobre a alteração na motilidade intestinal (diarréia e contratilidade *in vitro*) associada à mucosite induzida por irinotecano.
- Estudar a ação do infliximabe sobre a expressão de mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e óxido nítrico sintase induzida.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Animais:

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, pesando entre 20 e 25 g. Os animais foram colocados em gaiolas, num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$; ciclo de 12h claro/12h escuro, com livre acesso a água e ração padrão. Os animais foram fornecidos pelo biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os protocolos desenvolvidos estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC (protocolo 99/10).

3.2 Aparelhos e instrumentos laboratoriais:

- Agitador de tubos tipo Vortex cetomart MV
- Amplificador – AD Instruments, ML845 Powerlab 4/25
- Aquecedor com temperatura controlada
- Balança analítica Ohaus AS2600
- Balança analítica Marte AI200
- Bequers
- Câmera de contagem Neubauer
- Centrífuga Eppendorf 5804R
- ELISA ELX 800 – Biotek
- Espectrofotômetro Spectronic 20 Genesys
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turraz T8 e Dispergiestation T8.10 da Ika Labortechnik
- Lâmina lisa para microscopia 26 X 76 mm
- Lamínula 24X32 mm
- Material cirúrgico
- Medidor de pH Hanna Instruments HI 8519N
- Microscópio Óptico binocular Nikon e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10X
- Microscópio leica acoplado a computador
- Seringas (B-D Plastipack)

- Sistema de eletroforese Power Pac Basic (Bio Rad)
- Transdutor de força – AD Instruments, modelo MLT0201

3.3 Drogas

- Cloridrato de Irinotecano (Evoterin®, ampolas 5mL, 100mg/mL, Evolabis).
- Infiximabe (Remicade®, frasco-ampola de 100 mg de pó liofilizado, Schering Plough).

3.4 Indução da mucosite intestinal

A mucosite foi induzida de acordo com protocolo desenvolvido por Ikuno *et al.*, 1995 e adaptado para as condições experimentais do laboratório. Os animais receberam quatro injeções, por via intraperitoneal, de irinotecano na dose de 75 mg/kg, uma vez ao dia e foram avaliados no 5º dia após a primeira injeção.

3.5 Grupos experimentais

Protocolo 1: Ação do infliximabe nas alterações inflamatórias e morfofuncionais intestinais promovidas pelo irinotecano.

Os animais C57BL/6 foram divididos em grupos (n=5-11).

Grupo I: animais tratados com salina (SF 0,9%, i.p., durante 4 dias) e sacrificados no quinto dia;

Grupo II: animais tratados com salina (SF 0,9%, i.p., em dose única), seguido de irinotecano (75 mg/kg/dia, durante 4 dias, i.p.) sacrificados no quinto dia;

Grupo III: animais tratados com infliximabe (5 mg/kg, i.p. em dose única) e irinotecano (75 mg/kg/dia, durante 4 dias, i.p.) e sacrificados no quinto dia.

Protocolo 2: Avaliação da sobrevida e curva ponderal dos animais tratados com infliximabe e/ou irinotecano

Grupo IV: animais tratados com salina (SF 0,9%, i.p., durante 4 dias) e observados por 13 dias para avaliação da curva ponderal e de sobrevida

Grupo V: animais tratados com salina (SF 0,9%, i.p., em dose única), seguido de irinotecano (75 mg/kg/dia, durante 4 dias, i.p.) e observados por 13 dias para avaliação da curva ponderal e de sobrevivência

Grupo VI: animais tratados com infliximabe (5 mg/kg, i.p. em dose única) e irinotecano (75 mg/kg/dia, durante 4 dias, i.p.) e observados por 13 dias para avaliação da curva ponderal e de sobrevivência.

3.6 Avaliação de parâmetro hematológico

Os animais foram levemente anestesiados com éter etílico para coleta de 20µL de sangue do plexo orbitário. Esta amostra foi diluída imediatamente em 380µL de solução de Turk. A contagem total de leucócitos na amostra foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer para verificação do efeito do irinotecano e do infliximabe no que concerne ao efeito sobre o número de leucócitos circulantes (indução de leucopenia).

3.7 Avaliação do grau da diarreia apresentada

Aos eventos de diarreia, apresentados no quinto dia após o início do tratamento dos animais, foram atribuídos escores (KURITA *et al.*, 2000), como discutido a seguir (**FIGURA 2**):

Escore 0 = fezes com aspecto normal;

Escore 1 = fezes levemente alteradas, pouco umedecidas;

Escore 2 = fezes úmidas com pouca sujidade perianal;

Escore 3 = fezes úmidas com bastante sujidade perianal.

Esse parâmetro representa um indicativo de indução da mucosite, tendo em vista a associação do sinal diarreia à mucosite, observada na prática clínica.

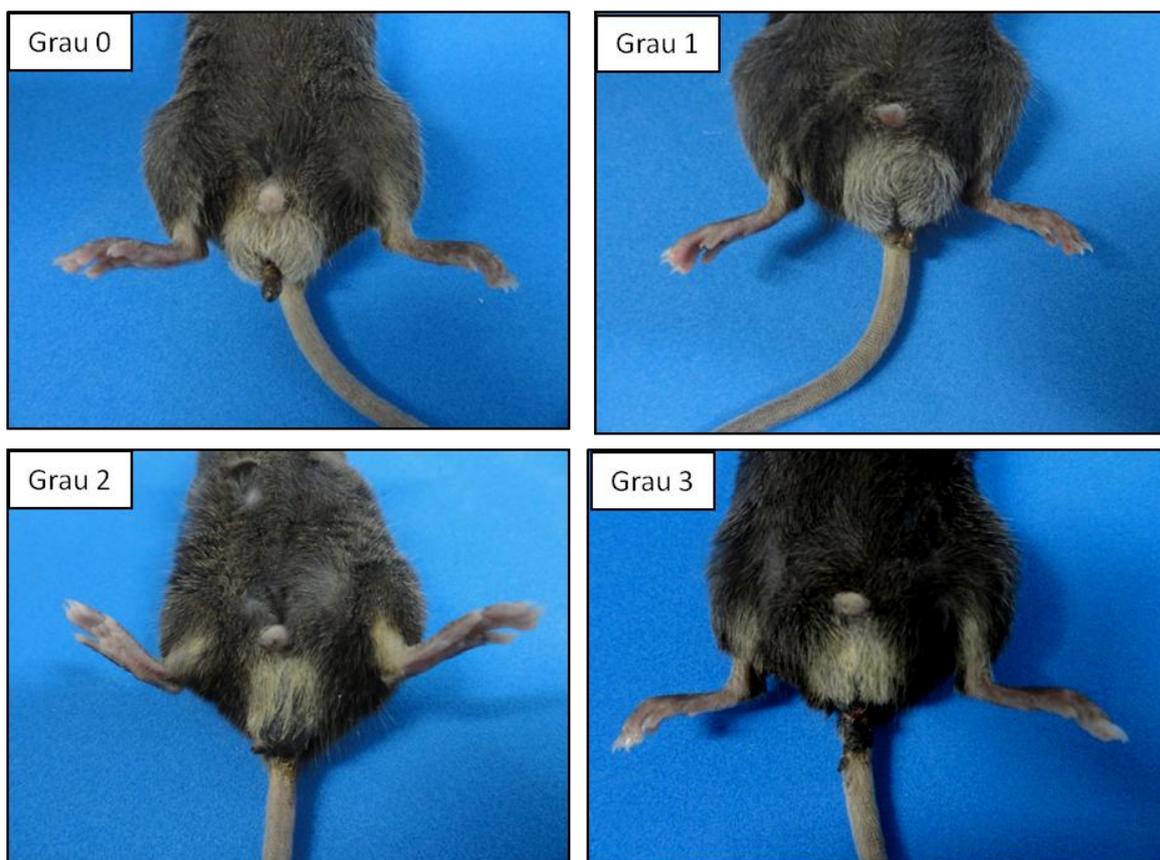


FIGURA 3 – Representação dos graus de diarreia pós-injeção de irinotecano.

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

3.8 Análise histopatológica e Morfometria da mucosa intestinal

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

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

0 = ausência de lesão;

- 1** = menos de 10% das criptas contêm células necróticas;
- 2** = mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta;
- 3** = mais de 10% das criptas contêm células necróticas com perda da arquitetura das criptas (<20%), os vilos encontram-se encurtados e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes;
- 4** = semelhante à 3, entretanto, é mais extensa com perda da arquitetura das criptas (>20%) e encurtamento dos vilos.

Para análise morfométrica, obteve-se a medida de vilos, considerada desde o ponto de encontro entre dois vilos até o topo do vilos em questão (altura do vilos), das criptas intestinais, definida como o ponto de encontro entre dois vilos medidas até o início da camada submucosa e, para correlação com a capacidade absorptiva, obteve-se a área do vilos, selecionando todo o vilos, desde o ponto de encontro entre dois vilos, passando pelo topo, chegando ao ponto de encontro com o vilos adjacente e indo ao ponto inicial (**FIGURA 3**). As medidas morfométricas foram calculada em μm e mm^2 utilizando-se o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilos e criptas por corte histológico.

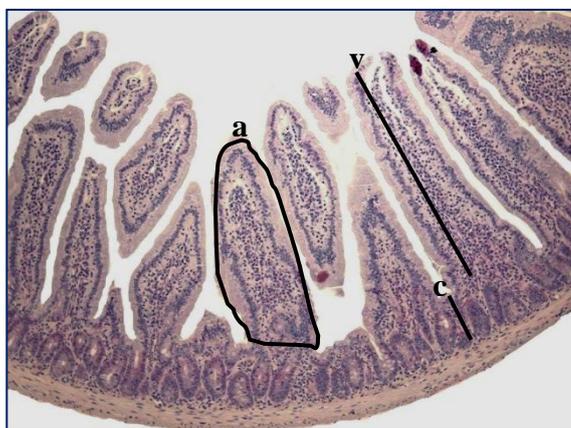


FIGURA 4: Representação esquemática das medidas morfométricas.

A medida do comprimento do vilos (v), da profundidade da cripta (c) e da área do vilos (a) foram utilizadas para a análise morfométrica.

3.9 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, foi utilizada como marcador da presença de neutrófilos no tecido inflamado, cuja presença será determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de ELISA, segundo método adaptado pelo descrito por Bradley *et al.* (1982).

Uma porção do duodeno foi coletada e incubada em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamonio), na proporção de 50 mg de tecido por mL, e homogeneizada e centrifugada (1500 g/20 min a 4°C). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e novamente centrifugado (10min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento de 7µL do sobrenadante (placas de 96 wells), 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H₂O) foram adicionados e lidos a 460 nm ($t_0=0$ min e $t_1=1$ min). A mudança na absorvância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e expressa como neutrófilos/mg de tecido (atividade de MPO).

3.10 Dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β

Os animais tiveram amostras do duodeno retirados no 5º dia para análise de citocinas e estocados em freezer -70°C até o momento do ensaio. O tecido coletado foi homogeneizado e processado como descrito por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A detecção das concentrações de TNF- α e de IL-1 foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA) conforme protocolo de Cunha *et al.*, 1993. Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com 2µg/mL de anticorpo anti-TNF α e anti-IL-1 β murino, diluídos em tampão de bicarbonato (pH 8.2) – 100 µL/poço. Foi realizada lavagem da placa (3x), seguido de bloqueio com albumina bovina 1% por 2 horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem das placas (3x), as amostras e a curva padrão de TNF- α e IL-1 β foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%. Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50µL do complexo avidina-peroxidase diluído 1:5000 foram adicionados. O reagente de cor 0-fenilenodiamina (OPD, 50µL) foi adicionado 15min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 15 a

20min. A reação enzimática foi parada com H₂SO₄ e a absorbância medida em espectrofotômetro a 490nm. O resultado foi expresso em pg/mL/mg de proteína.

3.11 Avaliação da expressão de iNOS por Western Blotting

Os animais foram sacrificados no 5º dia por deslocamento cervical e segmentos de duodeno foram removidos e mantidos em freezer a -70° C até o ensaio. As amostras foram submetidas à sonicação com solução de lise celular (Trinton X-100 1% e Nonidet P-40 0.2%) e EDTA (2mM), sendo transferidas posteriormente para tubos testes contendo inibidor de protease e centrifugadas a 14000 rpm a 4°C. A concentração protéica do sobrenadante foi determinada pelo ensaio de BCA – bicinchoninic acid (Pierce), em tubos eppendorf, com leitura em espectrofotômetro (absorbância de 562nm). Foi padronizada a quantidade de proteína para 50µg, de acordo com uma curva padrão para proteína. Os lisados foram congelados a -70° C até a análise. Foi realizada a fervura das amostras para desnaturação das proteínas, centrifugação e colocação das amostras em poços com gel de poliacrilamida 10% (SDS- Page), com o marcador de proteína (Invitrogen). A separação eletroforética foi realizada a 180V com o aparelho Power Pac Basic (Bio-Rad) até que as amostras atingissem o fim do gel (em média 20-30 minutos). O gel foi, então, transferido para uma membrana de nitrocelulose a partir de “sanduíche” contendo esponja, papel de filtro, gel e membrana. O aparato foi conectado na fonte de voltagem e submetido a 100V durante 1h, a 4° C. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada com leite desnatado 5% *overnight*, a fim de bloquear outras proteases. Seguiu-se a incubação com anticorpo primário diluído 1:800 em BSA 5% durante 3 horas. Após lavagens com tampão contendo TRIS, glicina, Tween 20 e água destilada, foi feita a incubação com anticorpo secundário, diluído 1:1000 em leite desnatado, durante 1 hora, em plataforma oscilante. Depois de lavar com o tampão de lavagem, foi feita a revelação da membrana de nitrocelulose pela técnica de ECL, em filme de raio-X (Kodak X-Omat), em sala escura. Após a revelação, o filme foi escaneado com o objetivo de mensurar a densitometria das bandas de proteínas.

3.12 Avaliação dos parâmetros funcionais em tiras isoladas de intestino (estudo in vitro)

Após 24h da última injeção de irinotecano, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras de intestino proximal dissecadas e transferidas para uma placa de Petri com solução nutritora de Tyrode (composição em mM: NaCl= 136; KCl= 5; MgCl₂ = 0,98; CaCl₂ = 2; NaH₂PO₄ = 0,36; NaHCO₃ = 11,9; glicose= 5,5). Cada intestino foi limpo de seus tecidos adjacentes e dividido em 2 pedaços de dimensões semelhantes que foram montados em câmaras de 5ml contendo solução de Tyrode, aerada continuamente e aquecida com bomba de circulação Haake FJ para manutenção da temperatura constante a 37°C. O sistema de registro isométrico consiste de um amplificador Dataq (PM-1000, WCE, USA), ao qual foram conectados transdutores de força Grass, modelo FT03C (Quincy, Mass., EUA). O tempo de equilíbrio da preparação foi de 30 minutos e a tensão de repouso de 1 g. As soluções com os fármacos foram preparadas pela adição da substância pura diretamente na solução fisiológica e armazenadas em freezer em concentrações 100 a 1000 vezes maiores que aquelas usadas na câmara durante os experimentos. As soluções dos constituintes que foram estudados eram frescas e agitadas em aparelho Vortex, imediatamente antes do uso. Para avaliar a viabilidade do tecido no início dos experimentos, as preparações foram expostas a soluções despolarizantes com 60 mM de KCl até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude (este período foi de aproximadamente 30 a 60 minutos além do tempo necessário para o equilíbrio da preparação). Os resultados apresentados foram expressos como percentual da média destas duas últimas contrações (**FIGURA 4**).

Para a realização do estudo, foram utilizados protocolos em que a contração é induzida com KCl e carbacol. As respostas experimentalmente observadas foram consideradas através das deflexões dos traçados originais obtidos pelo sistema de aquisição de dados e analisadas conforme cada situação apropriada, sendo então expressas em valores absolutos e valores percentuais em relação às respostas obtidas em períodos ou experimentos controle, conforme o tratamento especificado para cada protocolo experimental. Após a realização das curvas as tiras de intestino foram mantidas em estufa a 65°C até dissecação e posteriormente foram pesadas em balança de precisão.

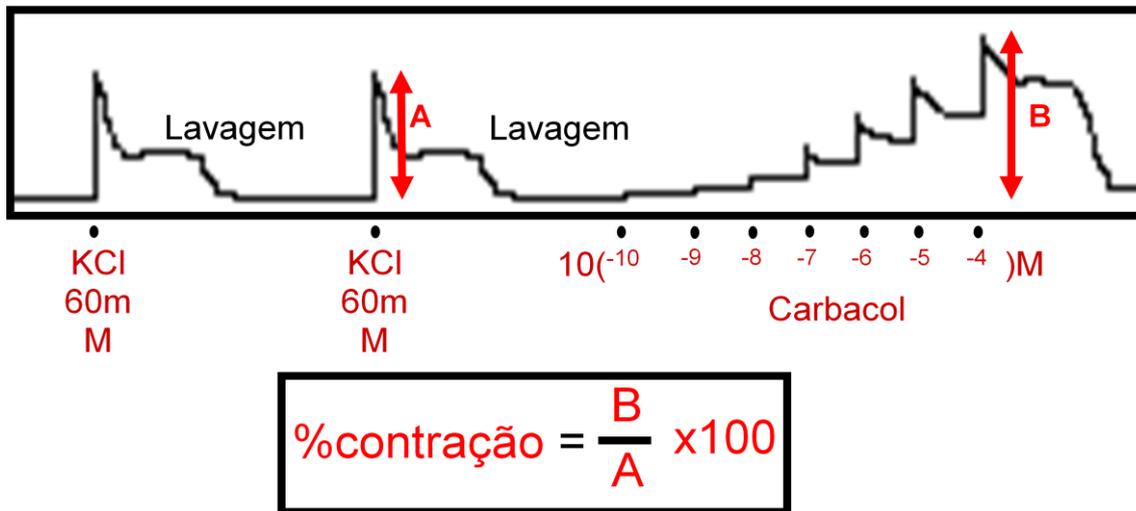


FIGURA 5 – Esquema de avaliação funcional intestinal *in vitro*

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística, realizada com o software GraphPad Prism[®], versão 5.0, foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA) ou Kruskal Wallis conforme propriedade respectivamente para dados paramétricos e não-paramétricos. Quando utilizado ANOVA, foi aplicado o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls ou teste de Bonferoni, baseando-se na continuidade das variáveis em análise e, quando utilizado Kruskal Wallis, seguiu-se o teste de Dunn. Para análise da sobrevida foi utilizado o teste de Log-Rank. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana (mínimo-máximo) (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Análise da curva ponderal e curva de sobrevida

A **figura 6** evidencia a redução da sobrevida dos animais tratados com Irinotecano na dose de 75 mg/kg/dia se comparado com os animais tratados apenas com salina ($p < 0,05$). Houve uma sobrevida de 100% dos animais tratados apenas com salina e de 57,14% no grupo de animais tratados com Irinotecano. Ao comparar-se, no entanto, a curva de sobrevida dos animais tratados com Infliximabe (5 mg/kg/dose única) associado ao Irinotecano com aqueles tratados somente com Irinotecano, verificou-se que estas foram idênticas, com a mesma taxa de sobrevida dos animais (57,14%).

Os animais submetidos ao tratamento com irinotecano apresentaram uma perda ponderal crescente a partir do primeiro dia após o início do tratamento (**FIGURA 7**), tendo atingido uma perda máxima de 22,84% no oitavo dia, a partir do qual houve uma tendência à recuperação em relação ao peso inicial. Os animais pré-tratados com infliximabe, apesar de, aparentemente, terem apresentado menor perda de peso, com uma perda máxima de 15,76%, atingida no sexto dia após o início do tratamento, tal diferença não foi significativa quando comparado com o grupo tratado com irinotecano. Não houve perda ponderal no grupo controle.

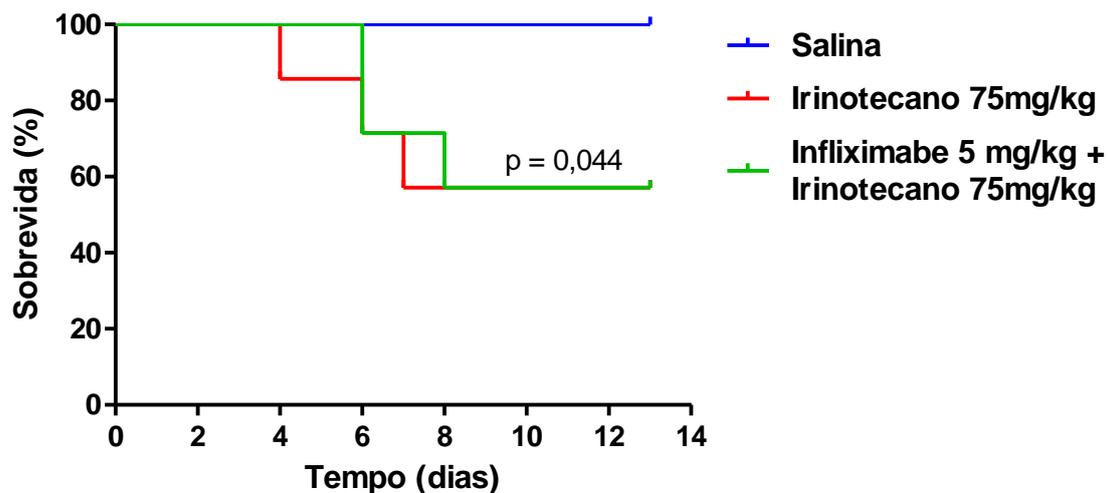


FIGURA 6 – O infliximabe não altera a sobrevivência dos animais no modelo de mucosite intestinal por Irinotecano

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infiximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram observados, diariamente, por 13 dias desde a primeira injeção para controle de mortalidade. O gráfico evidencia uma queda na sobrevivência em animais tratados com Irinotecano, se comparado com o controle. Tal efeito não se altera quando os animais são adicionalmente tratados com infliximabe. Valores representam o percentual de animais vivos comparados ao D1. Para análise estatística, foi utilizado o teste Log-Rank.

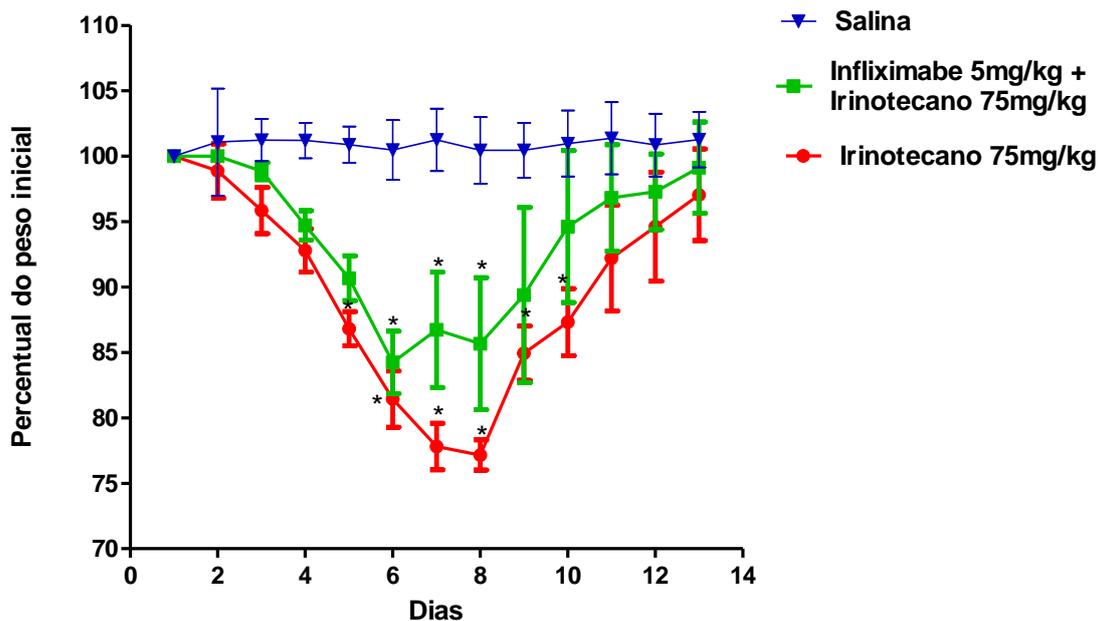


FIGURA 7 – O infliximabe não altera a curva ponderal dos animais no modelo de mucosite intestinal por Irinotecano

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infiximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram pesados diariamente por 13 dias desde a primeira injeção para controle da perda ponderal. O gráfico evidencia uma perda de peso crescente nos animais tratados com irinotecano, atingindo um máximo no oitavo dia de tratamento, quando uma perda de 22,84% foi verificada, tendo havido uma tendência à recuperação nos dias subseqüentes. Tal perda ponderal não foi alterada significativamente quando se utilizou infliximabe associado ao irinotecano. Valores representam o percentual do peso comparado ao peso inicial. * $p < 0,05$ vs. grupo controle. Para análise estatística, foi utilizado o teste 2-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

5.2. Ação do Infiximabe nas alterações morfológicas duodenais induzidas pelo Irinotecano.

As fotomicrografias (**FIGURA 8**) e os escores histopatológicos (**FIGURA 9**) indicam que o irinotecano (CPT-11) na dose de 75 mg/kg/dia, em comparação com animais tratados apenas com salina ($p < 0,05$), induziu necrose e apoptose de células das criptas, com intensa vacuolização da cripta e vilo e infiltração inflamatória na mucosa. O grupo tratado com irinotecano obteve uma mediana dos escores anatomopatológicos igual a 3 (3-4), enquanto o grupo controle obteve mediana igual a 0 (0-0). Nos animais tratados com infliximabe na dose de 5 mg/kg associado ao irinotecano na mesma dose descrita acima tais alterações morfológicas se mantêm, sem diferença significativa nos escores histopatológicos ao comparar-se com o grupo que recebeu apenas irinotecano, com mediana de 3 (2-4) (**FIGURA 9**).

Na análise morfométrica duodenal (**FIGURAS 10, 11, 12 e 13**), nota-se que o tratamento com irinotecano na dose de 75 mg/kg/dia induziu redução significativa ($p < 0,05$) no comprimento do vilo ($351,1 \pm 6,76 \mu\text{m}$), na área do vilo ($0,033 \pm 0,001 \text{mm}^2$) e na relação vilo/cripta ($2,24 \pm 0,06$) quando comparado com o controle tratado apenas com salina ($494,2 \pm 15,69 \mu\text{m}$; $0,055 \pm 0,004 \text{mm}^2$ e $3,46 \pm 0,13$, respectivamente). Nos animais tratados com Infiximabe (5 mg/kg) e Irinotecano, na mesma dose acima, houve aumento significativo ($p < 0,05$) do comprimento do vilo e da relação vilo/cripta ($392,5 \pm 8,97 \mu\text{m}$ e $2,74 \pm 0,08$, respectivamente), sem alteração na área no vilo ($0,03 \pm 0,001 \text{mm}^2$), quando comparado com os animais tratados apenas com irinotecano. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre todos os grupos no que se refere à profundidade da cripta.

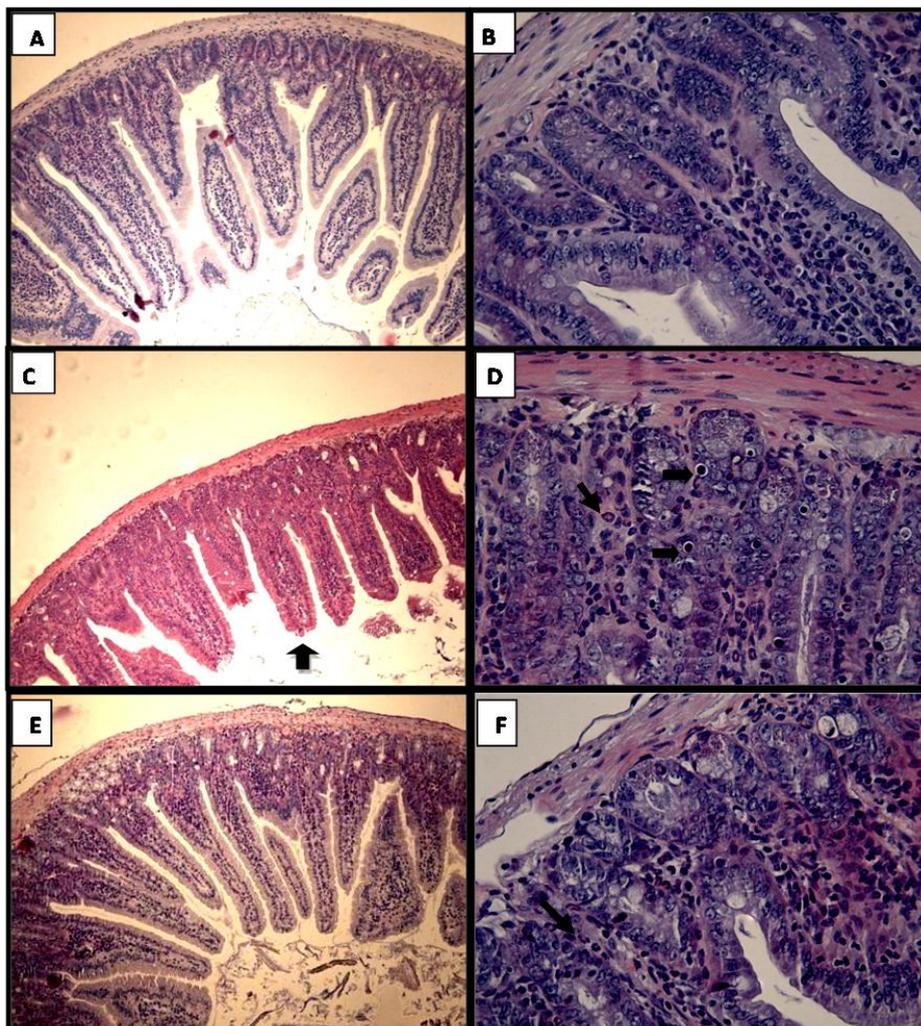


Figura 8 - Fotomicrografia de duodeno de camundongo injetado com salina 0,9%, Irinotecano ou Infliximabe+irinotecano.

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infliximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E. Na mucosa dos animais que receberam Irinotecano nota-se discreto encurtamento dos vilos (seta vertical, painel C), apoptose de células da cripta (setas horizontais, painel D) e infiltrado inflamatório na mucosa (seta diagonal, painel D). Nota-se, nos animais tratados com Infliximabe e Irinotecano, uma menor lesão na mucosa, com raros focos de células inflamatórias. **Painel A:** Controle salina 100X; **Painel B:** Controle salina 400X; **Painel C:** Irinotecano 100X; **Painel D:** Irinotecano 400X; **Painel E:** Infliximabe + Irinotecano 100X; **Painel F:** Infliximabe + Irinotecano 400X.

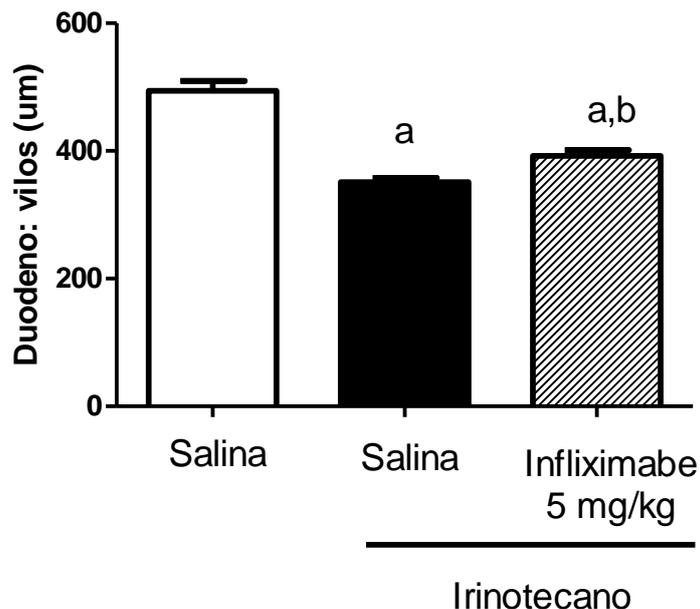


FIGURA 10 – Infiximabe previne o encurtamento do vilo em camundongos tratados com Irinotecano.

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infiximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfométrica. Nota-se, na figura, uma redução no comprimento dos vilos nos animais tratados com Irinotecano, efeito este, minimizado nos animais tratados com Infiximabe e Irinotecano. ^a $p < 0,05$ versus animal tratado com salina, ^b $p < 0,05$ versus animal tratado com irinotecano. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido de Student Newman Keuls.

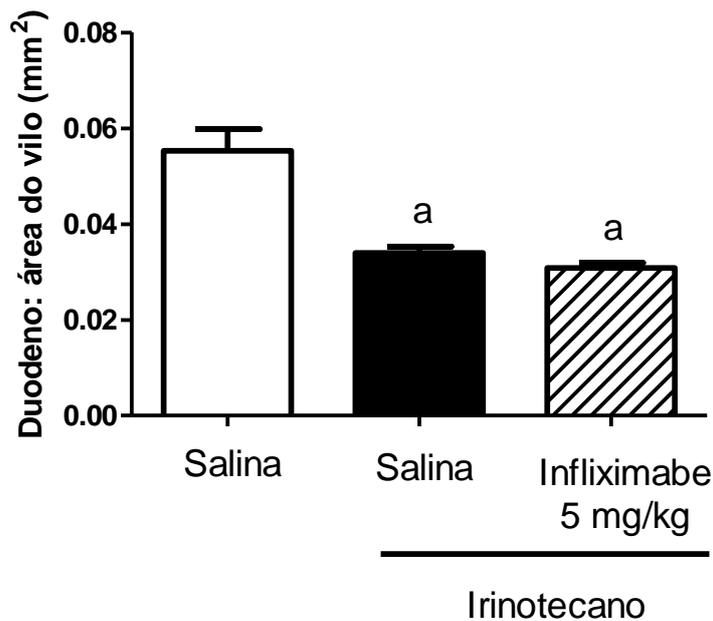


FIGURA 11 – Infiximabe não altera a área do vilão em camundongos tratados com Irinotecano.

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infiximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1^a injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfológica. Nota-se, na figura, uma redução na área dos vilões nos animais tratados com Irinotecano, efeito este, inalterado ($p > 0,05$) nos animais tratados com Infiximabe e Irinotecano. ^a $p < 0,05$ versus animal tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido de Student Newman Keuls.

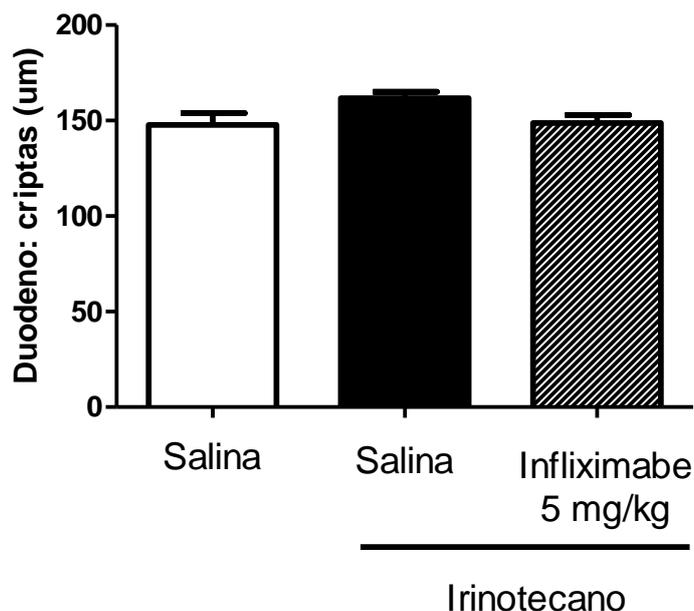


FIGURA 12 – Irinotecano associado ou não ao Infiximabe não altera a profundidade da cripta.

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infiximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfométrica. Nota-se, na figura, que o tratamento com irinotecano não alterou a profundidade da cripta, assim como não houve alteração com o tratamento com infiximabe e irinotecano. $P > 0,05$. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido de Student Newman Keuls.

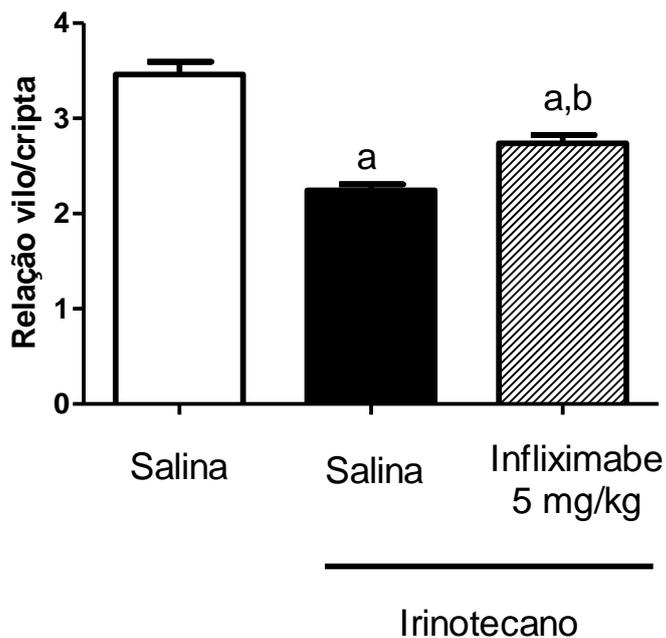


FIGURA 13 – Infliximabe previne as alterações sobre a razão vilo/cripta em camundongos tratados com Irinotecano.

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infliximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram sacrificados no quinto dia experimental. O duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E para posterior análise morfométrica. Nota-se, na figura, uma redução na razão vilo/cripta nos animais tratados com Irinotecano, ao comparar-se com o controle. Nos animais tratados com Infliximabe e Irinotecano há um aumento na razão vilo/cripta se comparado com o grupo tratado apenas com irinotecano. ^ap<0,05 versus animal tratado com salina, ^bp<0,05 versus animal tratado com irinotecano. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido de Student Newman Keuls.

5.3. Ação do Infliximabe sobre as alterações inflamatórias intestinais induzidas pelo Irinotecano

O efeito pró-inflamatório do Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) no duodeno foi verificado através do aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade de mieloperoxidase (MPO), como verificado na **figura 14**, e da expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), na **figura 15**. A atividade de MPO no grupo de animais tratados com Irinotecano apresentou um valor médio de $16,40 \pm 1,76$ U/mg de tecido, que diferiu significativamente do grupo injetado apenas com salina ($6,32 \pm 1,17$ U/mg de tecido). Adicionalmente, nos animais tratados com Infliximabe (5 mg/Kg/dia, i.p) e Irinotecano na dose descrita acima, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na atividade de MPO comparado ao grupo irinotecano, apresentando uma média de $8,74 \pm 1,96$ U/mg de tecido. Efeito semelhante ocorreu com a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da expressão de iNOS no grupo de animais tratados com Irinotecano, ao comparar-se com o grupo controle. Observou-se, também uma atenuação significativa ($p < 0,05$) deste efeito no grupo dos animais tratados com Infliximabe e Irinotecano (**FIGURA 15**).

Em associação a tais efeitos antiinflamatórios, o Infliximabe foi capaz de atenuar significativamente ($p < 0,05$) o aumento de IL-1 β induzido pela administração de Irinotecano (**FIGURA 16**). Verificou-se que o tratamento com Irinotecano aumentou a dosagem tecidual de IL1 β de $1,76 \pm 1,76$ pg/mL (grupo controle) para $431,5 \pm 158$ pg/mL. Por sua vez, a associação do Infliximabe ao Irinotecano reduziu esse valor para $72,55 \pm 23,86$ pg/mL.

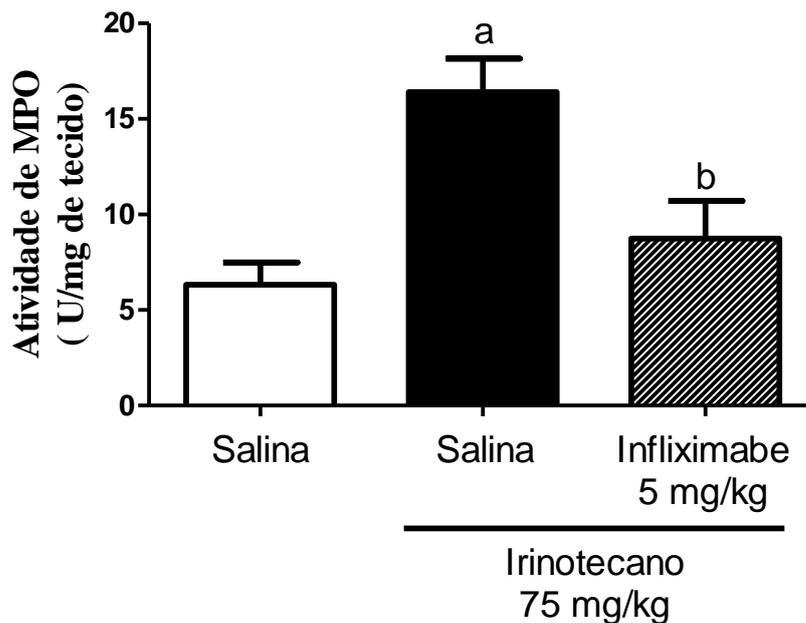


FIGURA 14 - Infiximabe inibe a atividade de mieloperoxidase no duodeno de camundongos tratados com irinotecano.

Os animais foram tratados com salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) ou Infiximabe (5 mg/Kg, e.v.) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, i.p.) e sacrificados no quinto dia experimental para remoção de amostra de duodeno para o ensaio de mieloperoxidase. A figura ilustra que o Irinotecano aumenta significativamente a atividade de MPO, comparado ao grupo salina, efeito este, inibido pela administração de infiximabe. Os valores representam a média \pm EPM e foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ versus grupo salina. ^b $p < 0,05$ versus grupo irinotecano.

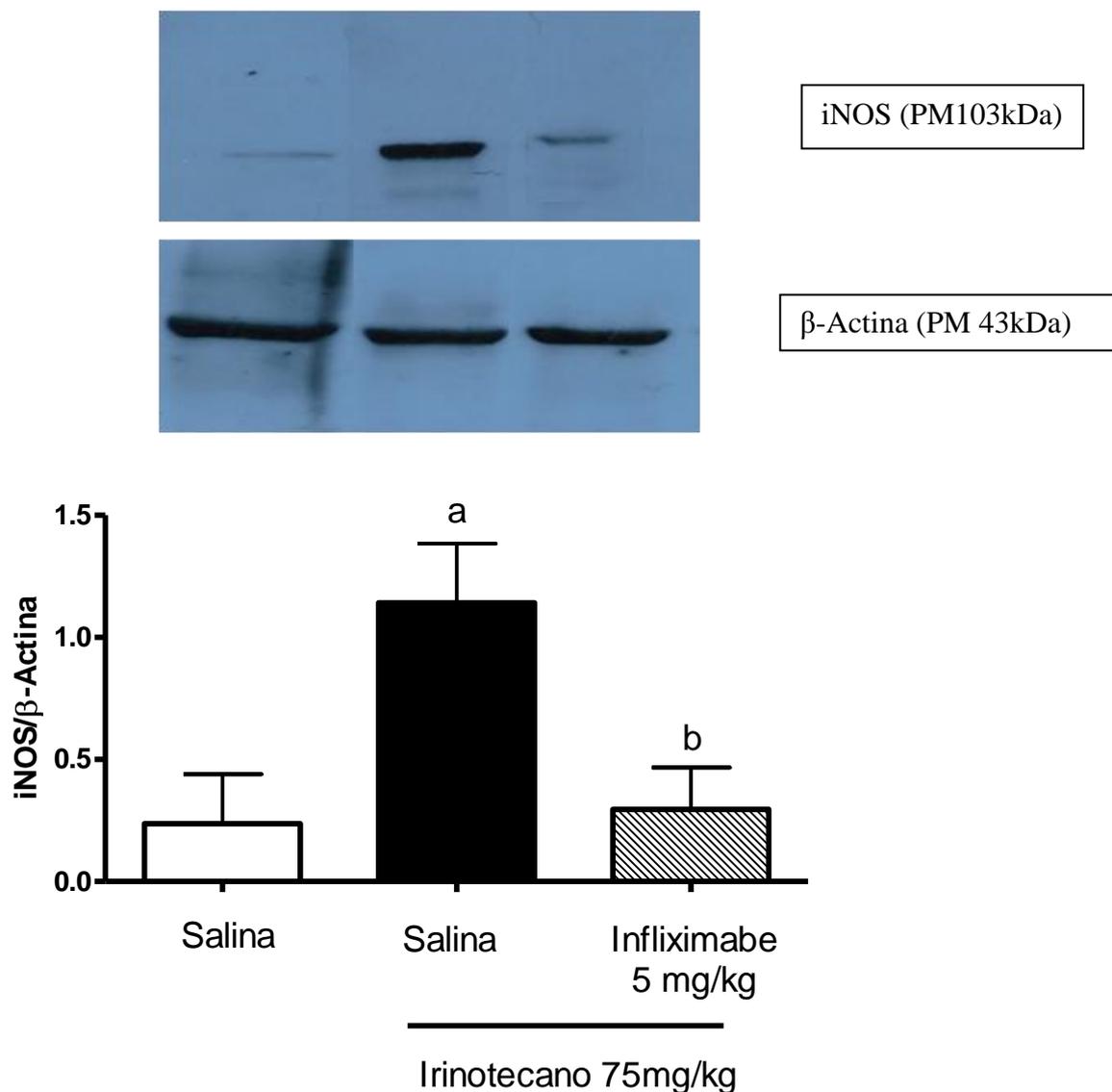


FIGURA 15 – Infliximabe reduz a expressão de óxido nítrico sintase induzida em animais tratados com Irinotecano.

Os animais foram tratados com salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) ou Infliximabe (5 mg/Kg, e.v.) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, i.p.) e sacrificados no quinto dia experimental para remoção de amostra de duodeno para a avaliação da expressão de iNOS por Western Blotting. A figura ilustra que o Irinotecano aumenta significativamente a expressão de iNOS, quando comparado com o grupo controle, efeito este, atenuado pela administração de Infliximabe. Os valores representam a média \pm EPM e foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls. ^a $p < 0,05$ versus grupo salina. ^b $p < 0,05$ versus grupo irinotecano.

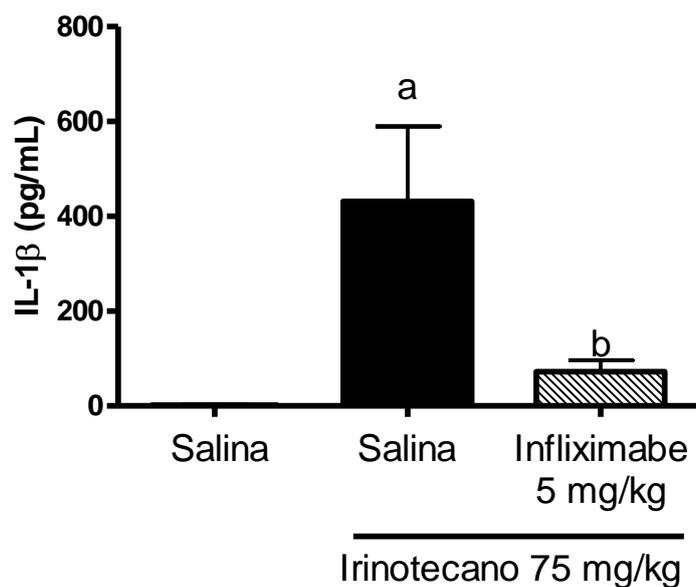


FIGURA 16 – Infliximabe reduz o nível tecidual de IL-1 β no duodeno de camundongos tratados com irinotecano.

Os animais foram tratados com salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) ou Infliximabe (5 mg/Kg, e.v.) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, i.p.) e sacrificados no quinto dia experimental para remoção de amostra de duodeno para dosagem de IL-1 β . A figura ilustra que o Irinotecano aumenta significativamente o nível tecidual de IL-1 β , comparado ao grupo salina, efeito este, inibido pela administração de infliximabe. Os valores representam a média \pm EPM e foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste de Bonferroni. ^a $p < 0,05$ versus grupo salina. ^b $p < 0,05$ versus grupo irinotecano.

5.4. Ação do Infliximabe sobre os parâmetros funcionais da mucosite intestinal induzida por Irinotecano

Nota-se, na **figura 17**, que o Irinotecano (75 mg/Kg/dia, i.p.) induziu significativo aumento ($p < 0,05$) da atividade contrátil do duodeno ao estímulo com carbacol, verificada *in vitro*, sendo esta resposta 261,82% maior que a contratilidade do duodeno de animais tratados apenas com salina. Nos animais tratados com Infliximabe (5 mg/Kg, i.p.) associado ao Irinotecano na mesma dose descrita acima, verificou-se uma responsividade do tecido ao carbacol 280% maior que a resposta contrátil do duodeno no grupo tratado apenas com salina, o que, ao comparar-se com os animais tratados apenas com Irinotecano, não representa uma diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Tais dados estão de acordo com a análise do grau de diarreia apresentada (**FIGURA 18**), onde se observou que o Irinotecano induziu aumento nos escores de diarreia ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle, porém não houve diferença estatística ao comparar os escores do grupo que recebeu Infliximabe e Irinotecano com os que receberam apenas Irinotecano ($p > 0,05$). O grupo controle apresentou mediana de escores de diarreia igual a 0 (0-0) e tanto os animais tratados apenas com Irinotecano como os que receberam Infliximabe e Irinotecano obtiveram uma mediana de 1 (0-2).

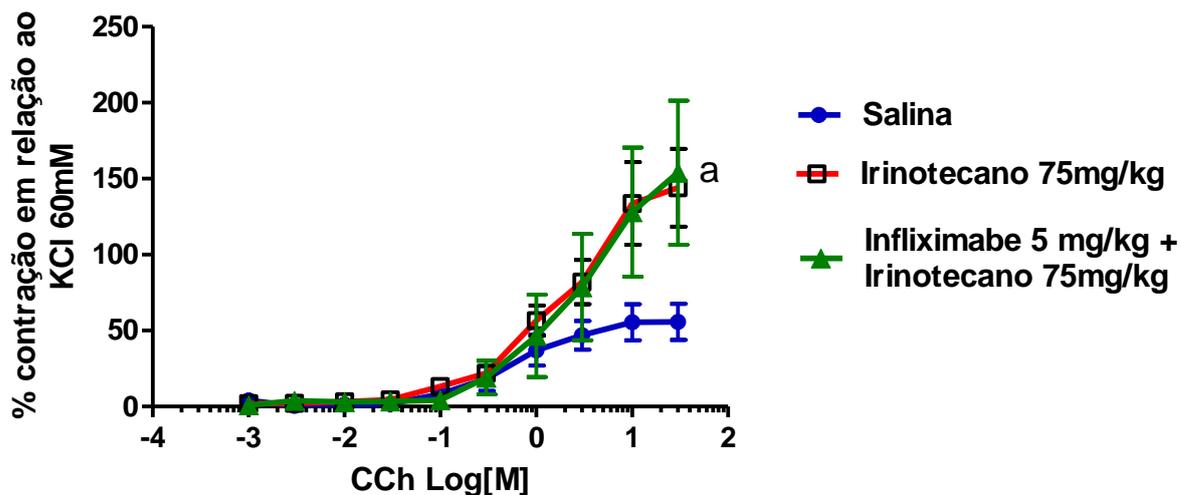


FIGURA 17 – O Infliximabe não altera a disfunção contrátil duodenal *in vitro* induzida por irinotecano em camundongos

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infliximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano) + Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram sacrificados no quinto dia experimental para o estudo de contratilidade duodenal *in vitro*. Nota-se, na figura, aumento da responsividade do tecido ao carbacol (CCh) nos animais tratados com Irinotecano ao comparar-se com os tratados apenas com salina. Tal resultado não se alterou ao utilizar-se o Infliximabe. $P < 0,05$ versus grupo controle tratado com salina. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido do teste de Student Newman Keuls.

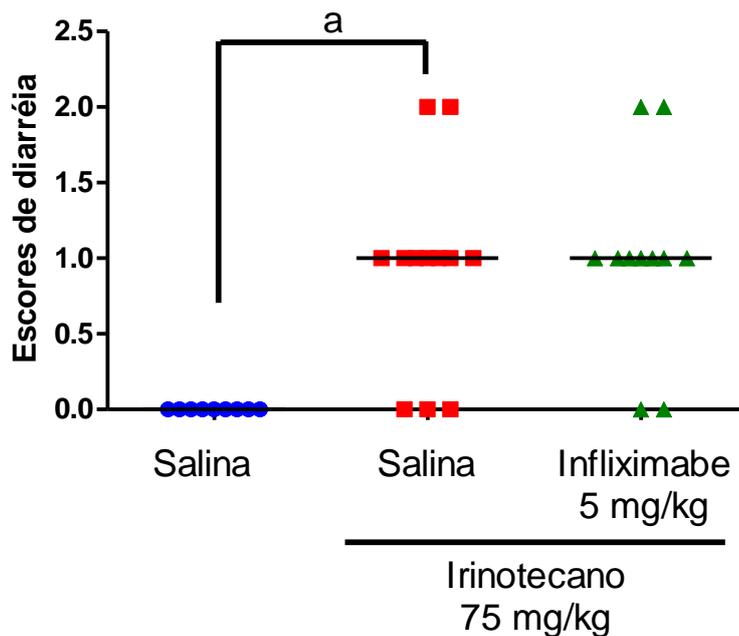


FIGURA 18 – O infliximabe não altera a intensidade da diarreia em camundongos tratados com Irinotecano.

Os animais receberam salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) ou Infiximabe (5 mg/Kg, e.v dose única antes da 1ª injeção de irinotecano)+ Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) e foram observados no quinto dia após a primeira dose para determinação do grau de diarreia apresentado. O gráfico evidencia que os animais tratados com Irinotecano apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado com os animais tratados apenas com salina. Tal efeito não altera-se quando o animal foi tratado com Infiximabe e Irinotecano. ^ap<0,05 versus grupo salina. Para análise estatística utilizou-se o teste Kruskal Wallis seguido do teste de Dunn.

5.5. Análise de parâmetro hematológico

Conforme verificado na **figura 19**, o Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) induziu leucopenia significativa ($p < 0,05$) nos animais (média de 7267 leucócitos x $10^3/\text{ml}$), quando comparado com o grupo tratado apenas com salina (média de 11100 leucócitos x $10^3/\text{ml}$). A contagem de leucócitos dos animais tratados com Infliximabe (5 mg/Kg, i.p) e Irinotecano (75 mg/Kg/dia, 4 dias, i.p) obteve uma média ainda menor ($p < 0,05$) que do grupo tratado apenas como Irinotecano (média de 4067 leucócitos x $10^3/\text{ml}$).

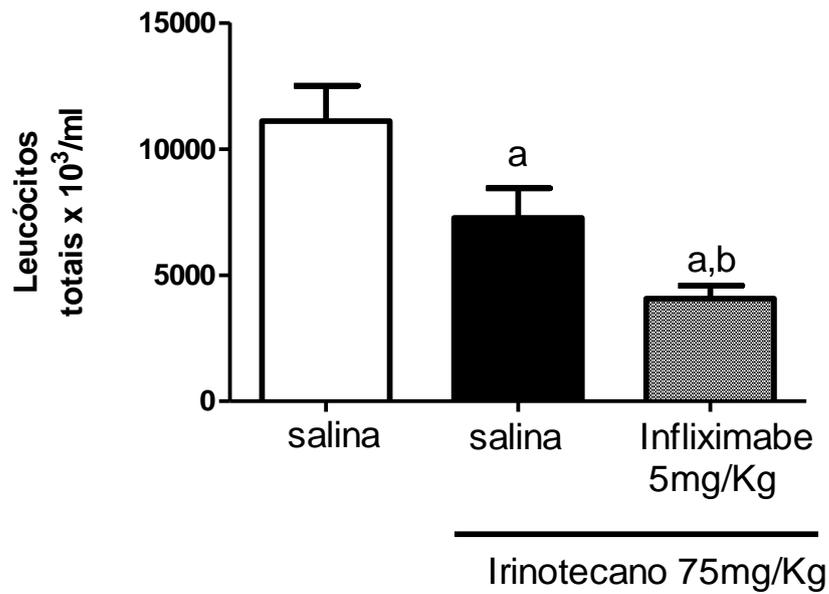


FIGURA 19 – O Infliximabe intensifica a leucopenia induzida pelo Irinotecano

Os animais foram tratados com salina (5 mL/Kg, e.v), Irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) ou Infliximabe (5 mg/Kg, e.v.) + Irinotecano (75 mg/Kg, i.p.) e amostras de sangue foram removidas no quinto dia experimental para contagem de leucócitos. O tratamento com Irinotecano induz leucopenia e esta é intensificada com a associação ao Infliximabe. ^ap<0,05 versus animal tratado com salina; ^b p<0,05. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA seguido de Student Newman Keuls.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o efeito do infliximabe, um potente e seletivo inibidor do TNF- α , na mucosite intestinal induzida por irinotecano, tendo sido evidenciado uma inibição nos parâmetros inflamatórios, mas sem efeito nas alterações funcionais.

A mucosite é um dos efeitos colaterais mais freqüentes e limitantes da quimioterapia, envolvendo o trato gastrointestinal como um todo e causando um espectro de sinais e sintomas que variam desde dor na cavidade oral e região abdominal a vômito e diarreia, podendo comprometer a dose e duração do tratamento (LOGAN *et al.*, 2007).

O reconhecimento de que a mucosite por quimio e radioterapia envolve não apenas o dano celular direto, mas ocorre como uma consequência de uma complexa cascata de eventos biológicos tem motivado a utilização de numerosas terapias alvo.

Até o momento, as opções disponíveis para o tratamento da mucosite intestinal são escassas e, muitas vezes, ineficientes. O guia terapêutico mais atualizado recomenda, para a mucosite intestinal, a utilização de ranitidina ou omeprazol para a prevenção de epigastralgia e loperamida ou octreotida para o tratamento da diarreia (KEEFE *et al.*, 2007), opções muitas vezes ineficazes.

O papel de citocinas na patogênese da mucosite intestinal tem sido investigado por vários estudos. Sonis (2004), ao descrever as cinco fases da mucosite intestinal, atribuiu importante papel à ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e consequente produção das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6. Tais achados foram corroborados por diversos outros estudos (LOGAN *et al.*, 2007a; LOGAN *et al.*, 2007b; LOGAN *et al.*, 2008; LOGAN *et al.*, 2009). Estudos do nosso grupo descreveram experimentalmente os danos na mucosa intestinal causado pelo tratamento com irinotecano, sugerindo a participação de TNF- α , IL-1 β e KC (análogo do IL-8 humano em camundongos) como importantes mediadores na patogênese da mucosite intestinal (MELO *et al.*, 2008). Adicionalmente, demonstrou-se uma atenuação das alterações na mucosa com a administração de pentoxifilina e talidomida, fármacos que interferem na produção de citocinas, dentre elas TNF- α (MELO *et al.*, 2008).

Em um modelo hipotético proposto de patogênese de mucosite intestinal por irinotecano, Freitas (2007) e Lima-Jr (2008) delegaram ao TNF- α um papel central na

cascata de eventos inflamatórios. É sugerido que o TNF- α é uma das vias de ativação da caspase-1, reponsável pela ativação de IL-18 e IL-1 β , e ainda ativa fatores de transcrição celulares para a síntese de outras citocinas, quimiocinas, iNOS e COX-2, com posterior liberação de óxido nítrico e prostanóides (LIMA-JR, 2008, MELO *et al.*, 2008).

As funções biológicas do TNF- α incluem a modulação do crescimento, diferenciação e proliferação de vários tipos de células, regulação da morte celular programada e de respostas inflamatórias agudas e crônicas, tendo implicação direta na patogênese de diversas doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, psoríase e doença de Crohn (PFEFFER, 2003).

O infliximabe, um anticorpo monoclonal anti-TNF α , tem comprovada eficácia clínica em doenças imunomediadas como doença de Crohn, artrite reumatóide, espondilite anquilosante, artrite psoriática, psoríase, granulomatose de Wegener, colite ulcerativa e sarcoidose (ZIDI *et al.*, 2010) e tem sido experimentalmente utilizado com bons resultados em modelos de asma aguda (DEVECI *et al.*, 2008), de transplante aórtico (WOLLIN *et al.*, 2009), de obesidade e diabetes (ARAÚJO *et al.*, 2007), de aneurisma de aorta abdominal (XIONG *et al.*, 2009) e de rejeição pós transplante intestinal (PECH *et al.*, 2010).

Tendo em vista a participação do TNF- α na mucosite intestinal, a ação de antagonistas não específicos de TNF- α na prevenção desta e a ação de antagonistas específicos de TNF- α em diversas doenças imunomediadas, decidimos estudar o papel do infliximabe, um antagonista específico de TNF- α , na mucosite intestinal induzida por irinotecano.

O modelo de indução de mucosite intestinal utilizado por Melo *et al* (2007) foi adaptado em camundongo C57BL/6 que, além de já ter sido utilizado satisfatoriamente em experimentos anteriores do nosso grupo (LIMA-JR, 2008), permite, na continuidade do estudo, a utilização de animais *knockout*. A utilização dessa espécie ainda é justificada pelo fato de o infliximabe ser um anticorpo quimérico com fração murina variável, o que permite o emprego desses animais nos estudos de modulação farmacológica com esse agente. Isso é corroborado por diversos trabalhos que utilizam o infliximabe em modelos murinos, tendo apresentado excelentes resultados (ARAÚJO *et al.*, 2007; DEVECI *et al.*, 2008; WOLLIN *et al.*, 2008; FRIES *et al.*, 2008; XIONG *et al.*, 2009). A dose de 5mg/kg já foi satisfatoriamente utilizada em outros estudos

(FRIES *et al.*, 2008) e é semelhante à dose clínica padronizada (manual do Remicade®, monografia do produto).

Conforme descrito no presente estudo, os animais apresentaram mucosite intestinal no quinto dia após a primeira dose de irinotecano, evidenciada pelo aumento nos escores de diarreia e alterações histopatológicas. Optou-se pela avaliação dos parâmetros no quinto dia experimental em decorrência da alta mortalidade verificada em dias subsequentes, tanto no presente estudo, como em outros trabalhos (FREITAS, 2007; LIMA-JR, 2008). MELO *et al* (2008) demonstraram significativa mucosite intestinal no quinto dia experimental, com intensa hipoplasia de vilos e criptas e apoptose em criptas do intestino delgado. Lima-Jr (2008) evidenciou aumento significativo nos escores de diarreia em camundongos C57BL/6 tratados com irinotecano na dose de 60mg/kg por quatro dias e avaliados no quinto dia experimental.

Neste estudo, na mucosa dos animais que receberam irinotecano, foi evidenciado encurtamento dos vilos, apoptose de células da cripta e infiltrado inflamatório na mucosa. Nos animais tratados com infliximabe e irinotecano tais alterações foram menos intensas ao comparar-se com os animais tratados apenas com irinotecano, tendo ocorrido atenuação significativa do encurtamento dos vilos, mas sem diferença significativa quando se compara a mediana dos escores com o primeiro grupo. Apesar de o infliximabe ter promovido recuperação parcial, aumentando o comprimento dos vilos, não foi capaz de aumentar a área total do vilos, sugerindo que a área da superfície, uma medida melhor relacionada com a capacidade absorptiva, não sofre interferência do tratamento com infliximabe. Apesar de ter sido evidente a alteração na arquitetura das criptas dos animais submetidos ao tratamento com irinotecano, não houve alteração na medida de profundidade das mesmas ao comparar-se com o grupo controle. Ao avaliar o efeito da talidomida, um inibidor não específico de TNF- α , na mucosite intestinal induzida por irinotecano, Melo *et al* (2008) não evidenciaram redução dos escores histopatológicos de mucosite no jejuno e íleo, tendo encontrado melhora apenas no duodeno (MELO *et al.*, 2008). O infliximabe, ao ser utilizado em um modelo de doença inflamatória intestinal induzida por indometacina, não foi capaz de alterar os escores macro e microscópicos teciduais, mas mostrou-se efetivo em diminuir a permeabilidade intestinal, sugerindo participação do TNF- α na manutenção e reparo da barreira epitelial. Os autores justificaram a ausência de melhora histopatológica pela

possibilidade de o infliximabe ser ativo em uma fase mais precoce (permeabilidade), com persistência da hiperresponsividade e do dano tecidual (CURY *et al.*, 2008).

Dentre as alterações histopatológicas verificadas no grupo de animais tratados com irinotecano, a presença de corpos apoptóticos foi a mais evidente. De acordo com o modelo de mucosite intestinal proposto por Sonis, a inflamação e apoptose que ocorrem na barreira mucosa resultam em descontinuidade da mesma, levando aos sintomas clínicos da mucosite (SONIS, 2004). Keefe *et al.* (2000), ao avaliar biópsia duodenais de pacientes em tratamento quimioterápico, evidenciaram que o efeito mais precoce da quimioterapia é o aumento de apoptose nas criptas, sendo evidente já no primeiro dia após o início do tratamento. Posteriormente, por volta do terceiro dia, é que as alterações morfométricas, como redução na área do vilo e na profundidade da cripta, se tornam evidentes (KEEFE *et al.*, 2000). Potten, Wilson e Booth (1997) demonstraram que todas as drogas citotóxicas em animais causam apoptose e hipoplasia das criptas (POTTEN, WILSON e BOOTH, 1997). Tem sido demonstrado que a apoptose induzida por TNF- α contribui significativamente para a perda de íons e água e passagem de pequenos antígenos em modelo de doença inflamatória intestinal (SCHULZKE *et al.*, 2006). No mesmo estudo, ao utilizar o infliximabe, houve uma normalização das taxas de apoptose por aumento da morte de células T e diminuição da apoptose de células epiteliais. Estudos mais aprofundados com o objetivo de avaliar o efeito de inibidores de TNF- α na apoptose intestinal induzida por quimioterapia são necessários.

Os camundongos que receberam irinotecano apresentaram leucopenia, também detectada no quinto dia, comprovando a mielossupressão esperada da droga. O tratamento com infliximabe aumentou significativamente a leucopenia nos animais submetidos ao tratamento com irinotecano. Tal resultado está de acordo com diversos trabalhos que relatam diminuição na contagem de leucócitos (neutrófilos) induzida por toda a família de inibidores de TNF- α (VIDAL, FONTOVA e RICHART, 2003; RAJAKULENDRAN *et al.*, 2006; THEODORIDOU *et al.*, 2006; WENHAM, GADSBY e DEIGHION, 2008; MONTANÉ *et al.*, 2007).

Clinicamente, essa diminuição na contagem de leucócitos raramente atinge valores críticos, sendo em geral transitória e sem complicações. Há relatos, no entanto, de infecções graves secundárias à neutropenia por inibidores de TNF- α (HASTINGS *et al.*, 2010). A relação causal entre o bloqueio de TNF- α e diminuição de contagem de neutrófilos, no entanto, permanece pouco compreendida. Há estudos sugerindo a

redistribuição de leucócitos, aumento de apoptose dos neutrófilos ou supressão da medula óssea como um resultado da inibição de citocinas como fatores causais, mas sem resultados conclusivos (MONTANE *et al.*, 2007). É importante considerar a leucopenia como um efeito colateral importante que pode limitar o uso clínico do infliximabe em pacientes submetidos a tratamentos mielossupressores concomitantes.

No presente estudo, o infliximabe foi capaz de reduzir significativamente todos os parâmetros inflamatórios avaliados na mucosite intestinal por Irinotecano.

A atividade mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, foi utilizada como marcador indireto de infiltração neutrofílica local (BRADLEY, CHRISTENSEN e ROTHSTEIN 1982), tendo apresentado significativo aumento no grupo tratado com irinotecano, o que corrobora com a hipótese da fase inflamatória da mucosite documentado em outros estudos (SONIS, 2004, SONIS *et al.*, 2004). A utilização do infliximabe, por sua vez, diminuiu significativamente a atividade de MPO, demonstrando um potencial antiinflamatório da droga.

A infiltração neutrofílica, traduzida por aumento de MPO, é uma característica de alterações inflamatórias. Durante processos infecciosos, os neutrófilos desempenham um papel importante na defesa do organismo, mas, em outros casos, a persistência desta entidade inflamatória no sítio lesivo pode contribuir para o dano tecidual (ALKHARFY *et al.*, 2011).

Diversos estudos demonstraram a capacidade do infliximabe em reduzir a atividade de MPO em doenças inflamatórias como artrite reumatóide, vasculite, doença de Crohn e espondilite anquilosante (FEIJOO *et al.*, 2009). O infliximabe mostrou-se ainda efetivo em reduzir a atividade de MPO em modelos experimentais de transplante de intestino delgado (PECH *et al.*, 2010).

Melo *et al.* (2007), observaram que o irinotecano foi capaz de aumentar a atividade de MPO no sétimo dia de indução de mucosite intestinal e que a talidomida, um inibidor não específico de TNF- α , bloqueia a elevação na atividade de MPO induzida pelo irinotecano.

O tratamento com infliximabe reduziu o nível tecidual da citocina inflamatória IL1 β nos animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano, sugerindo que a ativação de IL-1 β ocorre via TNF- α , uma vez que a inibição deste último resulta numa significativa redução no nível tecidual de IL-1 β . Em um trabalho utilizando metodologia semelhante, foi avaliado o efeito da pentoxifilina e talidomida na expressão

de citocinas pró inflamatórias na mucosite intestinal por irinotecano em camundongos (MELO *et al.*, 2007). A pentoxifilina, um derivado de metilxantina que reduz a expressão de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-8, foi efetiva em diminuir os níveis teciduais de TNF- α , IL-1 β e KC, além de ter sido efetiva em amenizar todos os parâmetros avaliados de mucosite intestinal. A talidomida, um derivado sintético do ácido glutâmico que inibe a produção do TNF- α e altera a farmacocinética plasmática do irinotecano e SN-38, diminuiu os níveis teciduais de TNF- α , sem afetar IL-1 β e KC e foi menos efetiva na proteção contra a mucosite intestinal. Logan e colaboradores (2008) detectaram aumento de expressão tecidual de TNF- α e IL-1 β ao longo de todo o trato gastrointestinal de ratos submetidos à mucosite por irinotecano. Em outro estudo, a inibição específica da IL-1 β com a utilização do antagonista do seu receptor, IL-1Ra, no entanto, não parece promover efeito protetor seja com relação aos parâmetros morfofuncionais ou inflamatórios da mucosite intestinal por irinotecano (LIMA-JR 2008).

Em associação a tais efeitos antiinflamatórios, o infliximabe reduziu significativamente a expressão de iNOS nos animais submetidos a mucosite intestinal por irinotecano. A iNOS é a forma induzida da enzima óxido nítrico sintase, expressa geralmente de forma não constitutiva, presente em resposta a citocinas durante o desenvolvimento de um processo inflamatório, levando à produção de óxido nítrico em maiores concentrações (NATHAN, XIE, 1994). Em baixas concentrações o óxido nítrico exerce um papel protetor contra lesões de mucosa. Contudo, em altas concentrações, quando derivado da iNOS, verifica-se um importante papel do NO na citotoxicidade, levando ao aumento de permeabilidade do epitélio intestinal (UNO *et al.*, 1997). Muitos estudos relatam que o NO, oriundo da atividade da iNOS, exibe propriedades deletérias, participando na fisiopatologia de doenças como, por exemplo, a cistite hemorrágica (SOUZA-FILHO *et al.*, 1997; RIBEIRO *et al.*, 2002), pancreatite (GÓMES-CAMBONERO *et al.*, 2000) e mucosite oral (LEITÃO *et al.*, 2007). Lima-Jr (2008) demonstrou a participação da iNOS na fisiopatologia da mucosite intestinal por irinotecano. Em seu estudo, foi evidenciado efeito protetor da aminoguanidina nas alterações histopatológicas, inflamatórias e funcionais avaliadas. Resultados semelhantes foram ainda obtidos com a utilização de animais *knockout* para iNOS.

A mucosite intestinal manifesta-se clinicamente por sintomas como empachamento, dor abdominal, vômito e diarreia, sendo este o sintoma mais marcante

(PICO, AVILA-GARAVITO e NACCACHE, 1998). A diarreia é observada em aproximadamente 70% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando diarreia de grau 3 ou 4 (**TABELA 1**) pode ser observada em 25% dos pacientes (KEEFE *et al.* 2007). Experimentalmente, a diarreia tem sido utilizada em diversos trabalhos como parâmetro de avaliação funcional de mucosite por quimioterápico (GIBSON *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2008; LOGAN *et al.*, 2008; LOGAN *et al.*, 2009). GIBSON *et al.*(2005) demonstraram que 40% dos ratos tratados com irinotecano (150mg/kg, 2 dias) apresentaram diarreia acentuada 72 horas após a primeira injeção da droga e esse percentual reduziu para 10% com o pré-tratamento com palifermina (fator de crescimento de queratinócitos). Melo *et al.*(2008) utilizaram a diarreia como parâmetro funcional para avaliar a mucosite intestinal por irinotecano (75mg/kg, 4 dias) em camundongos e o efeito da pentoxifilina e talidomida. Lima-Jr (2008) observou diarreia moderada a acentuada no quinto dia após o início do tratamento com irinotecano (75mg/kg, 4 dias) em camundongos C57BL/6.

No presente estudo, conseguimos utilizar satisfatoriamente a diarreia como parâmetro funcional, tendo sido evidenciado que os animais tratados com irinotecano apresentaram um aumento na mediana dos escores atribuídos ao parâmetro diarreia quando comparado com os animais tratados apenas com salina. Tal efeito, no entanto, não se alterou quando o animal foi tratado com infliximabe e irinotecano.

Trifan *et al.* (2002) investigaram o papel da COX-2 na patogênese da diarreia tardia induzida por irinotecano utilizando um modelo com ratos. Eles relataram aumento de expressão de COX-2 e PGE2 no cólon após o tratamento com irinotecano, atingindo o pico no quinto dia após o início do tratamento, coincidindo com a piora dos escores de diarreia. Adicionalmente, demonstraram que a inibição seletiva da COX-2, utilizando-se o celecoxibe, reduz significativamente a intensidade da diarreia, a perda de peso e a sobrevivência dos animais tratados com irinotecano (TRIFAN *et al.*, 2002; JAVLE *et al.*, 2007). Tais resultados sugerem um papel primordial do processo inflamatório mediado por COX-2 na fisiopatologia da diarreia tardia por irinotecano, com controle desta através da utilização de seu inibidor.

Outro parâmetro funcional utilizado foi a avaliação da atividade contrátil do duodeno ao estímulo com carbacol verificada *in vitro*. Soares *et al.*(2008) utilizaram, pela primeira vez na literatura, um modelo semelhante de contratilidade gástrica e

duodenal *in vitro* para avaliar a mucosite intestinal por 5-fluorouracil. Lima-Jr (2008) demonstrou que o irinotecano (60 mg/kg, 4 dias) induziu alterações contráteis no duodeno de camundongos, verificadas em experimento de contratilidade *in vitro* semelhante ao utilizado por nós. Mostrou ainda relação entre as alterações de contratilidade e os eventos diarréicos.

Nos animais tratados com irinotecano verificou-se aumento da responsividade do tecido ao carbacol (CCh), indicando aumento de contratilidade na mucosite intestinal. O infliximabe, no entanto, não foi capaz de diminuir tal efeito.

A loperamida, um antidiarréico com ação sobre os receptores opióides promove redução da motilidade intestinal, sendo hoje a ferramenta clínica mais utilizada para o tratamento de diarréia associada à quimioterapia (KEEFE *et al.*, 2007). Lima-Jr (2008), ao utilizar a loperamida em camundongos tratados com irinotecano, observou uma redução da responsividade do duodeno à acetilcolina *in vitro*, tendo sido efetiva ainda em reduzir os escores de diarréia. Não encontrou, no entanto, qualquer efeito nos parâmetros histopatológicos e inflamatórios.

Soares *et al.* (2008) demonstraram aumento da contratilidade gástrica e duodenal ao estímulo com carbacol associada às alterações histopatológicas e inflamatórias intestinais na mucosite por 5-FU em ratos. Evidenciaram, no entanto, que essa hiperresponsividade persiste mesmo após a reversão das alterações inflamatórias.

No estudo de Macedo *et al.* (2011), foi demonstrado que a ifosfamida promove um processo inflamatório na bexiga que está relacionado com uma diminuição da habilidade da musculatura lisa vesical em produzir respostas contráteis. Houve, no grupo de animais tratados com ifosfamida, indução de cistite hemorrágica e resposta da musculatura lisa vesical ao KCl e carbacol com valores de força máxima (Emáx) menores que os observados no tecido do grupo controle. A potência farmacológica dos agentes contráteis KCl e carbacol, no entanto, foi diferentemente alterada depois da indução da cistite. Enquanto a potência para o KCl foi diminuída (diminuição do pD_2) comparada com o controle, a resposta contrátil máxima foi atingida com uma concentração de carbacol menor que a obtida no tecido dos animais tratados com salina, o que indica aumento da potência deste agonista muscarínico (MACEDO *et al.*, 2011). Esse resultado sugere que a inflamação aguda pode modificar mecanismos sinápticos urinários. Baseado em tais conhecimentos, poderíamos supor, no caso da

mucosite intestinal por irinotecano, que há alteração em receptores muscarínicos ou canais iônicos associado ao processo inflamatório como causa da hiperresponsividade do tecido ao agonista muscarínico carbacol. Isso justificaria, pelo menos em parte, o porquê do infliximabe, mesmo tendo sido efetivo em diminuir o processo inflamatório, não ter alterado a hiperresponsividade duodenal ao carbacol.

Verificou-se, portanto, que a inibição específica do TNF- α , apesar de efetiva na reversão das alterações inflamatórias da mucosite intestinal por irinotecano não promoveu proteção no que diz respeito aos parâmetros funcionais avaliados. Resultado semelhante foi obtido por Melo *et al.* (2007) ao utilizar a talidomida, um derivado sintético do ácido glutâmico que inibe a produção do TNF- α e altera a farmacocinética plasmática do irinotecano e SN-38. Ela, de uma maneira semelhante ao infliximabe utilizado neste estudo, reduziu a infiltração neutrofílica e previniu parte das alterações morfométricas, mas não reduziu a gravidade da diarreia (MELO *et al.*, 2008), o que nos permite supor que a inibição do TNF- α , seja através de um inibidor específico como infliximabe, seja através do uso da talidomida não é suficiente para prevenir a diarreia induzida por irinotecano. A vantagem do infliximabe sobre a talidomida, no caso de um possível uso clínico, seria a possibilidade de uso do primeiro em gestante, já que estudos sugerem ausência de teratogenicidade provocada pelo uso de infliximabe durante a gravidez (DJOKANOVIC *et al.*, 2011). É importante, contudo, considerar a possibilidade dos riscos imunológicos de infecções e alteração de respostas a vacinas nos primeiros meses de vida. Há relato de um caso fatal de infecção micobacteriana disseminada em uma criança que recebeu a vacina BCG aos três meses de idade e que a mãe havia sido tratada com infliximabe durante a gestação (DJOKANOVIC *et al.*, 2011).

Até o momento, os resultados sugerem que a diarreia parece ocorrer de forma dissociada dos eventos inflamatórios. Contudo, Lima-jr (2008) demonstrou que o uso de um inibidor da interleucina-18, proteína ligante da IL-18, foi eficaz na proteção contra a disfunção e a inflamação secundárias ao tratamento com irinotecano. Além disso, conforme descrito acima, estudos que promoveram a inibição da cascata inflamatória mediada por COX-2, foram efetivos em prevenir a diarreia por irinotecano, uma forte evidência da participação da inflamação na patogênese da mucosite intestinal por este quimioterápico (TRIFAN *et al.*, 2002).

Levantam-se, assim, alguns questionamentos. O TNF- α seria a molécula inflamatória que apresentaria um papel mais central no desenvolvimento da mucosite? Além disso, ser um inibidor específico significa uma melhor eficácia em termos de ganho terapêutico?

Em um estudo para avaliar o efeito do infliximabe na mucosite oral por radioterapia em camundongos não foi encontrado eficácia deste em diminuir a ulceração epitelial, sugerindo que a inibição seletiva de TNF- α não tem impacto na incidência ou duração das alterações epiteliais ulcerativas na mucosite oral (HAAGEN *et al.*, 2009). Lima-Jr (2008) não verificou qualquer efeito protetor da inibição seletiva de IL-1 β (com o inibidor natural, IL-1Ra) na mucosite intestinal por irinotecano, seja com relação aos parâmetros morfofuncionais ou inflamatórios avaliados. Melo *et al.* (2007), por sua vez, ao utilizar a pentoxifilina, um inibidor não seletivo de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-8 no modelo de mucosite intestinal por irinotecano, demonstrou efetividade em amenizar os efeitos histopatológicos, inflamatórios e funcionais (diarréia) analisados.

É bastante conhecida a ativação sequencial do TNF- α e da IL-1 β como deflagradores da resposta inflamatória, bem como sua ação redundante em muitos processos patológicos, como estímulo para a migração de neutrófilos (MONTECUCCO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008) e ação sobre leucócitos, fibroblastos e células endoteliais (ABBAS, LICHTMAN, 2005). Desta forma, observa-se que a inibição isolada da ação do TNF- α ou da IL-1 β não permite modular de forma efetiva a deflagração ou a gravidade do processo patológico em desenvolvimento, tendo em vista a ação paralela dessas citocinas, o que pode explicar a falta de atividade do infliximabe neste estudo e da IL-1Ra em estudo anterior (LIMA-JR, 2008) quando administrados em animais submetidos à mucosite intestinal por irinotecano.

Portanto, a complexidade em termos fisiopatológicos nos leva a crer que há a necessidade de uma modulação de forma complementar, tanto da disfunção como da inflamação, mas como os mediadores inflamatórios, de uma forma individual, poderiam contribuir para a disfunção, ainda é um questionamento que merece melhores estudos.

7. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- A inibição seletiva do TNF- α com a utilização do infliximabe promove uma inibição dos parâmetros inflamatórios estudados (atividade de MPO, nível tecidual de IL-1 β e expressão de iNOS) na mucosite intestinal experimental induzida por irinotecano;
- A utilização do infliximabe, apesar de promover inibição dos parâmetros inflamatórios avaliados, não foi capaz alterar a sobrevida e de proteger contra as alterações funcionais na mucosite intestinal por irinotecano em camundongos.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. Citocinas, *in* *Imunologia celular e molecular*, tradução da 5^a edição, Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, p. 251-282, 2005.

ALKHARFY, K.M.; AL-DAGHRI, N.M.; AL-ATTAS, O.S.; ALOKAIL, M.S. The protective effect of thymoquinone against sepsis syndrome morbidity and mortality in mice. **International Immunopharmacology**, v. 11, p.250-254, 2011.

ARAÚJO, E.P.; DE SOUZA, C.T.; UENO, M.; CINTRA, D.E.; BERTOLO, M.B.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Infliximab restores glucose homeostasis in na animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, v. 148, n.12, p. 5991-5997, 2007.

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

CARNEIRO-FILHO, B.A.; LIMA, I.P.F.; ARAUJO, D. H.; CAVALCANTE, M. C.; CARVALHO, G.H.P.; BRITO, G.A.C.; LIMA, V.; MONTEIRO, S.M.N.; SANTOS, F.N.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A.A.M. Intestinal Barrier Function and secretion in Methotrexate-Induced Rat Intestinal Mucositis. **Digestive Disease and Science**, v. 49, n. 1, p. 65-72, 2004.

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

CHESTER, J.D.; JOEL, S.P.; CHEESEMAN, S.L.; HALL, G.D.; BRAUN, M.S.; PERRY, J.; DAVIS, T.; BUTTON, C.J.; SEYMOUR, M.T. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 6, p. 1125-1132, 2003.

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

CURY, D.H.B.; COSTA, J.E.; IRIKA, K.; MIJJI, L.; GARCEZ, A.; BUCHIGUEL, C.; SILVA, I.; SIPAHI, A. Protective effect of octreotide and infliximab in an experimental model of indomethacin-induced inflammatory bowel disease. **Dig Dis. Sci.**, v. 53, p. 2516-2520, 2008.

DEVECI, F.; MUZ, M.H.; KIRKIL, G.; TURGUT, T.; AKPOLAT, N. Evaluation of the anti-inflammatory effect of infliximab in a mouse model of acute asthma. **Respirology**, v. 13, p. 488-497, 2008.

DJOKANOVIC, N.; KLIEGER-GROSSMANN, C.; PUPCO, A.; KOREN, G. Safety of infliximab use during pregnancy. **Reprod Toxicol**, [publicada na internet antes da impressão da revista], 2011.

ELLIOTT, M.J.; MAINI, R.N.; FELDMANN, A.L.F.; CHARLES, P.; KATSIKIS, P.; BRENNAN, F.M.; WALKER, J.; BIJL, H.; GHAYEB, J.; WOODY, J.N. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. **Arthritis Rheum**, v. 36, n. 12, p. 1681-90, 1993.

FEIJOO, M.; TUNEZ, I.; TASSET, I.; MONTILLA, P.; PEREZ-GUIJO, V.; MUNOZ-GOMARIZ, E.; RUIZ, A.; SCHIOTIS, R.; COLLANTES, E. Infliximab reduces myeloperoxidase concentration in chronic inflammatory joint diseases. **Pharmacology**, v. 83, n. 4, p. 211-6. 2009.

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

FRIES, W.; MUJA, C.; CRISAFULLI, C.; COSTANTINO, G.; LONGO, G.; CRUZZOCREA, S.; MAZZON, E. Infliximab and etanercept are equally effective in

reducing enterocyte apoptosis in experimental colitis. **Int. J. Med. Sci.** v. 5, n. 4, p. 169-180, 2008.

GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; INGLIS, M.R.; CUMMINS, A.G.; KEEFE, D.M.K. Irinotecan causes severe small intestinal damage as well as colonic damage in the rat with implanted breast cancer. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 18, p. 1095-1100, 2003.

GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; KEEFE, D.M.K. Palifermin reduces diarrhea and increases survival following irinotecan treatment in tumor-bearing DA rats. **Int J Cancer**, v. 116, p. 464-470, 2005.

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

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

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

HAAGEN, J.; KROHN, H.; ROLLIG, S.; SCHIMIDT, M.; WOLFRAM, K.; DORR, W. Effect of selective inhibitors on oral mucositis: Preclinical studies. **Radiother and Oncol**, v. 92, p. 472-476, 2009.

HASTINGS, R.; DING, T.; BUTT, S.; GADSBY, K.; ZHANG, W.; MOOTS, R.J. Neutropenia in patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy. **Arthritis Care Res**, v. 62, p. 764-9, 2010.

HOMMES, D.W.; VAN DULLEMEN, H.M.; LEVI, M.; VAN DER ENDE, A.; WOODY, J.; TYTGAT, G.N.; VAN DEVENTER, S.J. Beneficial effect of treatment with a monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha antibody on markers of coagulation and fibrinolysis in patients with active Crohn's disease. **Haemostasis**, v. 27, n. 6, p. 269-77, 1997.

IKUNO, N., SODA H, WATANABE M, OKA M. Irinotecan (CPT-11) and characteristic mucosal changes in the mouse ileum and caecum. **J Natl Cancer Inst**, v. 87, p. 1876-88, 1995.

IYER, L.; KING, C.D.; WHITINGTON, P.F.; GREEN, M.D.; ROY, S.K.; TEPHLY, T.R.; COFFMAN, B.L.; RATAIN, M.J. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. **J. Clin. Inves**, v. 101, n. 4, p. 847-854, 1998.

JAVLE, M.M.; CAO, S.; DURRANI, F.A.; PENDYALA, L.; LAWRENCE, D.D.; SMITH, P.F.; CREAVER, P.J.; NOEL, D.C.; IYER, R.V.; RUSTUM, Y.M. Celecoxib and mucosal protection: translation from an animal model to a phase I clinical trial of celecoxib, irinotecan and 5-fluorouracil. **Clin Cancer Res**, v. 13, p. 965-971, 2007.

KEEFE, D.M.; 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, n. 4, p. 385-389, 1997.

KEEFE, D.M.K.; BREALEY, J.; GOLAND, G.J.; CUMMINS, A.G. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**, v. 47, p. 632-637, 2000.

KEEFE, D.M.; SCHUBERT, M.M.; ELTING, L.S.; SONIS, S.T.; EPSTEIN, J.B.; RABER-DURLACHER, J.E.; MIGLIORATI, C.A.; MCGUIRE, D.B.; HUTCHINS, R.D.; PETERSON, D.E. Mucositis study section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated

clinical practice guideline for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer.**, v. 109, n. 5, p. 820-831, 2007.

KOIZUMI, F.; KITAGAWA, M.; NEGISHI, T.; ONDA, T.; MATSUMOTO, S.; HAMAGUCHI, T.; MATSUMURA, Y. Novel SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, NK012, Eradicate Vascular Endothelial Growth Factor-Secreting Bulky Tumors. **Cancer Res**, v. 66, n. 20, p. 10048-10056, 2006.

KURITA, A.; KADO, S.; KANEDA, N.; ONOUE, M.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 46, n. 3, p. 211-20, 2000.

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

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

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

LIMA-JR, R.C.P. Estudo morfofuncional e dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal por irinotecano (CPT-11) em camundongos: papel da caspase-1, interleucina-18 e óxido nítrico. 2008, 200f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.-J.; GIBSON, R.J.; SONIS, S.T.; KEEFE, D.M.K. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer

treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer treat Rev**, v. 33, p. 448-460, 2007.

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

LOGAN, R.M.; GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; STRINGER, A.M.; SONIS, S.T.; KEEFE, D.M.K. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 62, p. 33-41, 2008.

LOGAN, R.M.; STRINGER, A.M.; BOWEN, J.M.; GIBSON, R.J.; SONIS, S.T.; KEEFE, D.M.K. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, p. 239-251, 2009.

MACEDO, F.Y.B.; MOURÃO, L.T.C.; PALHETA-JR, R.C.; JUCÁ, D.M.; LIMA-JR, R.C.P.; SÁ-NETO, J.; MAGALHÃES, P.J.C.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.H.L.P.; BRITO, G.A.C.; RIBEIRO, R.A. Cyclooxygenase-2 contributes to functional changes seen on experimental hemorrhagic cystitis induced by ifosfamide in rat urinary bladder. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 67, p. 935-943, 2011.

MANDARA, J. L. & STAFFORD, J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. **J. Clin. Invest**, v. 83, p. 724-727, 1989.

MELO, M.L.; BRITO, G.A.; SOARES, R.C.; CARVALHO, S.B.; SILVA, J.V.; SOARES, P.M.; VALE, M.L.; SOUZA, M.H.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 61, n. 5, p. 775-784, 2008.

MONTANE, E.; SALLES, M.; BARRIOCANAL, A.; RIERA, E.; COSTA, J.; TENA, X. Antitumor necrosis factor-induced neutropenia: a case report with Double positive rechallenges. **Clin. Rheumatol**, v. 26, p. 1527-1529, 2007.

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

NAKADA, M.; TAM, S.H.; WOUFLE, D.S.; CASPER, K.A.; SWERLICK, R.A.; GHRAYEB, J. Neutralization of TNF by the antibody cA2 reveals differential regulation of adhesion molecule expression on TNF-activated endothelial cells. **Cell Adhes Commum**, v. 5, n. 6, p. 491-503, 1998.

NAKAMURA, K.; HONDA, K.; MIZUTANI, T. *et al.* Novel strategies for the treatment of inflammatory bowel disease: selective inhibition of cytokines and adhesion molecules. **World J Gastroenterol**, v. 12, p. 4628-4635, 2006.

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

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Gastrointestinal complications (PDQ[®]). Diarrhea. Disponível em: < www.cancer.gov >. Acesso em 28 de junho de 2011.

OLIVEIRA, S.H.; CANETTI, C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration induced by IL-1beta depends upon LTB(4) released by macrophages and upon TNF-alpha and IL-1beta released by mast cells. **Inflammation**, v. 31, n. 1, p. 36-46, 2008.

PARRILLI, G.; IAFFAIOLI, R.V.; MARTORANO, M.; CUOMO, R.; TAFUTO, S.; ZAMPINO, M.G.; BUDILLON, G.; BIANCO, A.R. Effects of anthracycline therapy on intestinal absorption in patients with advanced breast cancer. **Cancer Res.**, v. 49, n. 13, p. 3689-3691, 1989.

PECH, T.; FINGER, T.; FUJISHIRO, J.; PRAKTIKNJO, M.; OHSAWA, I.; ABU-ELMAGD, K.; LIMMER, A.; HIRNER, A.; KALFF, J.C.; SCHAEFER, N. Perioperative infliximab application ameliorates acute rejection associated inflammation after intestinal transplantation. **Am J of Transplant**, n. 10, p. 2431-2441, 2010.

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

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 14, p. 185-191, 2003.

PICO, J-L.; AVILA-GARAVITO, A.; NACCACHE, P. Mucositis: it occurrence, consequences and treatment in the oncology setting. **The oncologist**, v. 3, p. 446-51, 1998.

PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. **N Engl J Med**, v. 347, p. 417-429, 2002.

POTTEN, C.S.; WILSON, J.W.; BOOTH, C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. **Stem Cells**, v. 15, p. 82-93, 1997.

PRESENT, D.H.; RUTGEERTS, P.; TARGAN, S.; HANAUER, S.B.; MAYER, L.; HOGEZAND, R.A.; PODOLSKY, D.K.; SANDS, B.E.; BRAAKMAN, T.; DEWOODY, K.L.; SCAIBLE, T.F.; VAN DEVENTER, J.H. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 18, p. 1398-405, 1999.

RAJAKULENDRAN, S.; GADSBY, K.; ALLEN, D.; O'REILLY, S.; DEIGHTON, C. Neutropenia while receiving anti-tumor necrosis factor treatment for rheumatoid arthritis (letter). **Ann Rheum Dis**, v. 65, p. 1678-9, 2006.

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

ROCHA-LIMA, C.M.; GREEN, M.R.; ROTCHE, R.; MILLER, W.H.J.R.; JEFFREY, G.M.; CISAR, L.A.; MORGANTI, A.; ORLANDO, N.; GRUIA, G.; MILLER, L.L. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. **J Clin Oncol**, v 22, n. 18, p. 3776-83, 2004.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 115, n. 7, p. 1265-75, 1995.

SANDBORN, W.J.; HANAUER, S.B. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agent, pharmacology, clinical results and safety. **Inflamm Bowel Dis**, v. 5, p. 119-33, 1999.

SCHULZKE, J.D.; BOJARSKI, C.; ZEISSIG, S.; HELLER, F.; BITTER, A.H.; FROMM, M. Disrupted barrier function through epithelial cell apoptosis. **Ann NY Acad. Sci.** v. 1072, p. 288-299, 2006.

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

SHEALY, D.J.; VISVANATHAN, S. Anti-TNF antibodies: lessons from the past, roadmap for the future. In: Chernayovsky, Y, Nissim, A, editors. Therapeutics antibodies. **Handb of exp pharmacol**, p. 101-129, 2008.

SIEGEL, S.A.; SHEALY, D.J.; NAKADA, M.T.; LE, J.; WOULFE, S.; PROBERT, L.; KOLLIAS, G.; GHRAYEB, J.; VILCEK, J.; DADDONA, P.E. The mouse/human

chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes tnf in vitro and protects transgenic mice from cachexia and tnf lethality in vivo. **Cytokine**, v. 7, n. 1, p. 15-25, 1995.

SKUBITZ, K.M. Glutamine as a potential treatment for the prevention of chemotherapy induced mucositis. **J Infus Chemother**, v. 4, p. 64-67, 1994.

SOARES, P.M.G.; MOTA, J.M.; GOMES, A.S.; OLIVEIRA, R.B.; ASSREUY, A.M.; BRITO, G.A.; SANTOS, A.A.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, p. 91-98, 2008.

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

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

SONIS ST, FAY EG. Oral complications of cancer therapy. **Oncology**, v. 16, p. 680–686, 2002.

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

STRINGER A.M.; GIBSON, R.J.; LOGAN, R.M.; BOWEN, J.M.; YEOH, A.S.; BURNS, J.; KEEFE, D.M.. Chemotherapy- induced diarrhea is associated with changes in the luminal environment in the DA rat. **Exp. Biol. Med**, v. 232, n. 1, p. 96-106, 2007.

STRINGER, A.M.; GIBSON, R.J.; BOWEN, J.M.; LOGAN, R.M.; ASTHON, K.; YEOH A.S.J.; AL-DASOOQI, N.; KEEFE, D.M.K. Irinotecan-induced mucositis

manifesting as diarrhea corresponds with amended intestinal flora and mucin profile. **Int. J. Exp. Path.**, v. 90, p. 489-499, 2009.

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

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

TALLMAN, M.N.; MILES, K.K.; KESSLER, F.K.; NIELSEN, J.N.; TIAN, X.; RITTER, J.K.; SMITH, P.C. The contribution of intestinal UDP-glucuronosyltransferases in modulating 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38)-induced gastrointestinal toxicity in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 320, n. 1, p. 29-37, 2007.

THEODORIDOU, A.; KARTSIOS, C.; YIANNAKI, E.; MARKALA, D.; SETTAS, L. Reversible T-large granular lymphocyte expansion and neutropenia associated with adalimumab therapy. **Rheumatol Int**. v. 27, p. 201-2, 2006.

TRIFAN, O.C.; DURHAM, W.F.; SALAZAR, V.S.; HORTON, J.; LEVINE, B.D.; ZWEIFEL, B.S.; DAVIS, T.W.; MASFERRER, J.L. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Res**, v. 2, p. 5778-5784, 2002.

UNNO, N.; WANG, H.; MENCONI, M.J.; TYTGAT, S.; LARKIN, V.; SMITH, M.; MORIN, M.J.; CHAVEZ, A.; HODIN, R.; FINK, M.P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. **Gastroenterology**, v. 113, p. 1246-1257, 1997.

VAN DULLEMEN, H.M.; WOLBINK, G.J.; WEVER, P.C.; VAN DER POLL, T.; HACK, C.E.; TYTGAT, G.N.; VAN DEVENTER, S.J. Reduction of circulating secretory phospholipase A levels by anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody in patients with severe Crohn's disease. Relation between tumor necrosis factor and secretory phospholipase A in healthy humans and active Crohn's disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 33, n. 10, p. 1094-8, 1998.

VIDAL, F.; FONTOVA, R.; RICHART, C.; Severe neutropaenia and thrombocytopaenia associated with infliximab (letter). **Ann Intern Med**, v. 139, p. 63, 2003.

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

WENHAM, C.; GADSBY, K.; DEIGHION, C. Three significant cases of neutropenia with etanercept (letter). **Rheumatology (oxford)**, v. 47, p. 76-7, 2008.

WOLLIN, M.; ABELE, S.; BRUNS, H.; WEYAND, M.; KALDEN, J.R.; ENSMINGER, S.M.; SPRIEWALD, B.M. Inhibition of TNF- α reduces transplant arteriosclerosis in a murine aortic transplant model. **Transplantation**, v. 22, p. 342-349, 2009.

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

XIONG, W.; MACTAGGART, J.; KNISPEL, R.; WORTH, J.; PERSIDSKY, Y.; BAXTER, B.T. Blocking TNF- α attenuates aneurysm formation in a murine model. **J. Immunol.**, v. 183, n. 4, p. 2741-6, 2009.

ZIDI, I.; MESTIRI, S.; BARTEGI, A.; AMOR, N.B. TNF- α and its inhibitors in cancer. **Med Oncol**, v. 27, p. 185-198, 2010.