



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**VENÚCIA BRUNA MAGALHÃES PEREIRA**

**NOVO MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELA  
ASSOCIAÇÃO DE IRINOTECANO E 5-FLUOROURACIL EM  
CAMUNDONGOS C57BL/6**

**FORTALEZA**

**2013**

VENÚCIA BRUNA MAGALHÃES PEREIRA

NOVO MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO  
DE IRINOTECANO E 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.

FORTALEZA

2013

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

- 
- P436n      Pereira, Venúcia Bruna Magalhães.  
              Novo modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-Fluorouracil em camundongos C57BL/6 / Venúcia Bruna Magalhães Pereira. – 2013.  
              104 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.  
              Área de Concentração: Farmacologia.  
              Orientação: Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior.
1. Doenças inflamatórias intestinais. 2. Mucosite. 3. Fluorouracil I. Título.

---

CDD 616.34

VENÚCIA BRUNA MAGALHÃES PEREIRA

NOVO MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA PELA ASSOCIAÇÃO DE  
IRINOTECANO E 5-FLUOROURACIL EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de  
Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof(a). Dr(a). Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **DEDICATÓRIA**

*A Deus por sua companhia invisível.*

*Aos meus pais e amigos por simplesmente acreditarem.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, amigo de todas as horas, pela força para prosseguir nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Dr. **Roberto César Pereira Lima Júnior**, por ser um orientador melhor do que eu poderia esperar, por ser o bom ouvinte nas adversidades, por ter as palavras certas nas horas de aflição e dúvida, pela orientação deste trabalho, pela ajuda, incentivo e paciência demonstrada em todos os momentos. Por ser fonte de incentivo e exemplo de dedicação à ciência.

Ao Prof. Dr. **Ronaldo de Albuquerque Ribeiro** pela valorosa oportunidade de mostrar a mim mesma que eu era capaz de fazer tudo aquilo que eu sonhava fazer. Além das valiosas contribuições para a realização deste trabalho e por ser também grande exemplo de pesquisador.

À Profa. **Gerly Anne de Castro Brito**, pelas análises histopatológicas realizadas neste trabalho.

Aos professores **Pedro Jorge Caldas Magalhães** e **Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal** pela participação nesta banca de mestrado e por suas contribuições.

Aos meus pais **Alberto Pereira** e **Osvanete Magalhães** e **Tia Albertina** que se dedicaram para me darem a oportunidade de realizar este trabalho. Pelos bons ouvintes que são. Por terem continuado firmes e retos apesar de minha impaciência quando as coisas não davam certo. Por me mostrarem que tudo na vida dá certo quando se crê nas coisas de Deus.

Às minhas outras mães de coração (**Tia Fátima**, **Dra. Socorro**, **Prof (a). Aparecida**, **Prof(a). Augusta** e **“Tia” Miriam**), por sempre acreditarem em meu potencial. Por terem me dado a chance de conviver com exemplos de força, perseverança e paciência, por me ensinarem coisas boas. Pela alegria constante.

Aos amigos, **Lívia Batista**, **Natacha Queiroz**, **Delvane Rodrigues**, **Íris Cristina**, **Anielle Torres**, **Andressa Hellen**, **Tatiane Silva**, **Aline Venâncio**, **Karol Oliveira**, pelo convívio às vezes nem tão calmo ou mesmo na ausência. Vocês foram terra firme que Deus

me enviou para firmar meus pés. Sempre procurados nas horas difíceis e sempre prontos para ajudar.

A todos os colegas do Laboratório da Inflamação e do Câncer (LAFICA), **Ana Paula, Carlos Wagner, Amilcar Dornelas, Deysi Wong, Karol Sabóia, Larisse Lucetti, Maraíza Teixeira, Eudmar Marcolino, Camila Fernandes** pela companhia durante esta jornada e por sempre estarem dispostos a ajudar.

A **Ana Carla** por sua especial paciência e ajuda dentro e fora do laboratório.

A **Silvandira (Vandinha)**, por tornar tudo mais simples. Você é um presente para todos no laboratório.

As demais técnicas do LAFICA e do Departamento de morfologia.

Aos professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos conhecimentos cedidos e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao **CNPq, CAPES e FUNCAP** pelo apoio financeiro.

## RESUMO

**Introdução:** Mucosite intestinal é um efeito adverso comum dos regimes anticâncer de primeira linha para o tratamento do câncer colorretal. Dentre esses fármacos estão o irinotecano e 5-FU utilizados em associação. Muitos estudos têm sido realizados sobre a patogênese da MI. No entanto, novas investigações são necessárias, pois o curso da MI pode variar de acordo com o fármaco e regime empregados. Objetivou-se então desenvolver um novo modelo experimental de MI induzida pela combinação de IRI e 5-FU em camundongos.

**Métodos e Resultados:** camundongos C57BL/6 (20-25g, n=6) foram injetados com salina (100µL, i.p), IRI (30 ou 45 mg/kg, i.p), 5-FU (25, 37,5 ou 50 mg/kg, i.p) ou IRI+5-FU em doses combinadas por 4 dias. No 7º dia, diarreia, perda de peso e contagem de leucócitos foram registradas. Após a eutanásia dos animais, amostras do íleo foram coletadas para análise histopatológica, atividade de mieloperoxidase (neutrófilo/mg proteína), níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 (pg/mg tecido). Teste Kaplan-Mayer log rank, Kruskal Wallis/Dunn's ou teste ANOVA/Bonferroni foram usados para análise estatística.  $p < 0,05$  foi aceito como significativo. A melhor combinação de dose para induzir a MI sem mortalidade importante no 7º dia foi 5-FU (37,5 mg/kg) + IRI (45 mg/kg) (0% mortalidade), que foi então usada para estudos subsequentes. IRI+5-FU induziu ( $p < 0,001$ ) diarreia (2[0-3]), perda de peso (86,7 $\pm$ 3,9g), e leucopenia (7,3 $\pm$  2,3 $\times 10^3$ ) versus grupo salina (0[0-1]; 101,1 $\pm$ 0,6; 215,5 $\pm$  54,1, respectivamente) ou cada droga dada sozinha (5-FU: diarreia (0[0-1]), perda de peso [92,6 $\pm$ 2,7], e leucopenia [30,4 $\pm$  13,4]; IRI: diarreia (0[0-1]), perda de peso [94,8 $\pm$ 2,1], e leucopenia [49,2 $\pm$  5,5]). Adicionalmente, IRI+5-FU induziu infiltrado de células inflamatórias, perda de vilos e arquitetura das criptas (4[4-4]), aumento na atividade de MPO (14641 $\pm$ 1598 neutrófilo/mgproteína), TNF-a (3,2 $\pm$ 0,9 pg/mg de tecido), IL-6 (1,4 $\pm$ 0,5 pg/mg de tecido) níveis teciduais versus grupo injetado com salina (0[0-1], 5747 $\pm$ 1155; 0,7 $\pm$ 0,2; 0,3 $\pm$ 0,1) ou com fármacos injetados isoladamente (5-FU: dano intestinal (2.5[2-3]), MPO [3788 $\pm$ 1212], TNF- $\alpha$  [0,7 $\pm$ 0,2], IL-6 [0,2 $\pm$ 2,3]; IRI: dano intestinal (1[0-2]), MPO [3580 $\pm$ 1613], TNF- $\alpha$  [0,4 $\pm$ 0,2], IL-6 [0,07 $\pm$ 0,05]) ( $p < 0,05$ ).

**Conclusão:** Desenvolvemos um novo modelo experimental de MI induzida pela combinação de IRI+5-FU em camundongos, que abre perspectiva para um maior conhecimento sobre a patogênese da MI.

**Palavras-chave:** Inflamação. Mucosite intestinal. Irinotecano. 5-Fluorouracil.



## ABSTRACT

**Introduction:** Intestinal mucositis is a common side effect of anticancer regimens for first-line treatment of colorectal cancer. Among such drugs are irinotecan and 5-FU used in combination. Many studies have been conducted on the pathogenesis of MI. However, further investigations are necessary, because the course of MI may vary according to the drug regimen and employees. Then aimed to develop a new experimental model of MI induced by the combination of IRI and 5-FU in mice. **Methods and Results:** C57BL/6 mice (20-25g, n=6) were injected with saline (100 $\mu$ L, i.p), IRI (30 or 45 mg/kg, i.p), 5-FU (25, 37.5 or 50 mg/kg, i.p) or IRI+5-FU for 4 days. On day 7, diarrhea, weight loss, and blood leukocyte count were registered. Following animal euthanasia, ileum samples were collected for histopathological analysis, myeloperoxidase activity (MPO, neutrophil/mg protein), TNF- $\alpha$  and IL-6 levels (pg/mg tissue). Kaplan-Mayer log rank test, Kruskal Wallis/Dunn's or ANOVA/Bonferroni's test was used for statistical analysis.  $p < 0.05$  was accepted. The best dose combination able to induce IM with no important mortality on day 7 was 5-FU (37.5 mg/kg) +IRI (45 mg/kg) (0% mortality), which was then used for subsequent studies. IRI+5-FU induced ( $p < 0.001$ ) diarrhea (2[0-3]), weight loss (86.7 $\pm$ 3.9g), and leukopenia (7.3 $\pm$  2.3  $\times 10^3$ ) versus saline group (0[0-1]; 101.1 $\pm$ 0.6; 215.5 $\pm$  54.1, respectively) or each drug given alone (5-FU: diarrhea (0[0-1]), weight loss [92.6 $\pm$ 2.7], and leukopenia [30.4 $\pm$  13.4]; IRI: diarrhea (0[0-1]), weight loss [94.8 $\pm$ 2.1], and leukopenia [49.2 $\pm$  5.5]). In addition, IRI+5-FU induced inflammatory cells infiltration, and loss of villi and crypt architecture (4[3-4]), increased in MPO activity (14641 $\pm$ 1598 neutrophil/mgproteín), TNF-a (3.2 $\pm$ 0.9 pg/mg tissue), IL-6 (1.4 $\pm$ 0.5 pg/mg tissue) tissue levels versus saline-injected group (0[0-1], 5747 $\pm$ 1155; 0.7 $\pm$ 0.2; 0.3 $\pm$ 0.1) or the drugs injected alone (5-FU: Intestinal damage (2.5[2-3]), MPO [3788 $\pm$ 1212], TNF- $\alpha$  [0.7 $\pm$ 0.2], IL-6 [0.2 $\pm$ 2.3]; IRI: Intestinal damage (1[0-2]), MPO [3580 $\pm$ 1613], TNF- $\alpha$  [0.4 $\pm$ 0,2], IL-6 [0.07 $\pm$ 0.05]) ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** We developed a new experimental model of IM induced by the combination of IRI+5-FU in mice, which opens perspective for a more appropriate knowledge concerning the pathogenesis of IM.

**Keywords:** Inflammation. Intestinal mucositis. Irinotecan. 5-Fluorouracil.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$  Alfa

$\beta$  Beta

$\mu$ L Microlitro

$\mu$ M Micrômetro

$^{\circ}$ C Graus Celsius

5-FU 5-Fluorouracil

ANOVA Análise de Variância

APC 7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina

BSA Albumina sérica bovina

CPT-11 Cloridrato de irinotecano

CCR Câncer colorretal

d Dia

DAB 3,3 diaminobenzidine-peróxido

DNA Ácido desoxirribonucleico

DPD Diidropirimidina desidrogenase

DTNB Ácido 5,5-dithiobis-2-nitro-benzóico

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA Ensaio imunoenzimático

EPM Erro padrão da média

FDA Food and Drug Administration

FdUMP Fluorodioxuridina monofosfato

FdUTP Fluorodioxuridina trifosfato

FUTP Fluorouridina trifosfato

g Grama

G-CSF Fatores estimuladores de colônia de granulócitos

HTAB Hexadecitrimetilamônio

H<sub>2</sub>O Água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrogênio

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Ácido sulfúrico

IL Interleucina

INCA Instituto Nacional do Câncer

i.p. Intraperitoneal

IRI Irinotecano

Kg Quilograma

LV Leucovorin

M Molar

MI Mucosite intestinal

min Minutos

mg Miligrama

mL Mililitro

mm<sup>3</sup> Milímetro cúbico

MPO Mieloperoxidase

MTX Metotrexato

n Número

NaCl Cloreto de sódio

NaOH Hidróxido de sódio

NF-KB Fator nuclear Kappa B

NOSi Óxido nítrico sintase induzida

NPC 7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina

OMS Organização Mundial de Saúde

PAF Fator de ativação plaquetária

pH Potencial hidrogeniônico

PMN Polimorfonucleares

PBS Solução tamponada de fosfato

pg Picograma

PTX Pentoxifilina

RNA Ácido Ribonucléico

RPM Rotação por minuto

SN-38 Metabólito ativo do irinotecano

SN-38G SN-38 glicuronídeo

TGI Trato gastro intestinal

TLD Talidomida

TNF- $\alpha$  Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TRIS Tampão tris-hidroximetilaminometano

TS Timidilato sintase

UDP-GT enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase

VEGF Vascular endotelial growth factor

WHO Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
Figura 1.	Estrutura química do 5-Fluoruracil e da uracila	3
Figura 2.	Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil	4
Figura 3.	Estrutura química do cloridrato de irinotecano (CPT-11) lactona	6
Figura 4.	Estrutura química do SN-38 lactona	7
Figura 5.	Metabolismo do Irinotecano	8
Figura 6.	Fases da diarreia associada ao irinotecano	16
Figura 7.	Protocolo para indução de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-FU	26
Figura 8.	Representação dos graus de diarréia de acordo com escores de intensidade, pós-injeção de Irinotecano e 5-FU em camundongos C57BL/6	28
Figura 9.	Taxa de mortalidade nos protocolos para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	35
Figura 10.	Variação ponderal nos protocolos de tratamento para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	37
Figura 11.	Fotomicrografia da mucosa do duodeno após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	45
Figura 12.	Fotomicrografia da mucosa do jejuno após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	46
Figura 13.	Fotomicrografia da mucosa do ileo após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	47
Figura 14.	Fotomicrografia da mucosa do colon após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	48
Figura 15.	Efeito do protocolo associado de indução de mucosite intestinal sobre a morfometria intestinal de camundongos C57BL/6	49
Figura 16.	Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em diferentes segmentos intestinais de camundongos C57BL/6	52

Figura 17.	Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6) no íleo de camundongos C57BL/6	54
Figura 18.	Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre a contagem total e diferencial de leucócito em camundongos C57BL/6	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
Tabela 1.	Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012	2
Tabela 2.	Escore de avaliação da diarreia em camundongos	27
Tabela 3.	Escore de análise histopatológica para intestino delgado	29
Tabela 4.	Escore de Análise histopatológica para cólon	30
Tabela 5.	Avaliação dos escores de diarreia no primeiro protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	39
Tabela 6.	Avaliação dos escores de diarreia no segundo protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	40
Tabela 7.	Avaliação dos escores de diarreia no terceiro protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	41
Tabela 8.	Avaliação dos escores de diarreia no quarto protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	42
Tabela 9.	Resumo dos parâmetros analisados durante a padronização do protocolo de indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU	43
Tabela 10.	Efeito da associação de IRI e 5-FU nos escores histopatológicos de indução de mucosite intestinal	50



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. Câncer	1
1.2. 5-Fluorouracil	3
1.3. Irinotecano (CPT-11)	5
1.4. Mucosite Intestinal	9
1.5. Diarreia induzida por quimioterapia	14
1.6. Modelos para estudo da mucosite	16
<b>2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	19
<b>3. OBJETIVOS</b>	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	22
4.1. Equipamentos e instrumentos laboratoriais	22
4.2. Fármacos, soluções e corantes	22
4.3. Animais utilizados nos protocolos experimentais	23
4.4. Aspectos éticos	24
4.5. Modelo experimental de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-FU	24
4.6. Avaliação dos parâmetros gerais da mucosite intestinal	27
4.7. Análise estatística	32
<b>5. RESULTADOS</b>	33
5.1. Padronização do modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de IRI e 5-FU	33
5.2. Modelo padronizado de mucosite intestinal induzida pela associação de IRI e 5-FU: Ensaio biológicos	43
5.2.1. Análise histopatológica e morfometria	44
5.2.2. Dosagem de mieloperoxidase	51
5.2.3. Dosagem de citocinas	53
5.2.4. Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre o leucograma	55

<b>6. DISCUSSÃO</b>	57
<b>7. CONCLUSÃO</b>	70
<b>REFERÊNCIAS</b>	71

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer

O câncer é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de doenças (mais de 100) que podem afetar qualquer parte do corpo. Caracteriza-se pelo desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular, resultando em uma ampliação anormal do número de células, que podem invadir tecidos adjacentes e espalhar-se para outros órgãos, provocando metástases que são a principal causa de morte por essa doença (GUIMARÃES & ROSA, 2008; INCA, 2013; WHO, 2013).


Segundo dados atuais da OMS, a maior parte das mortes por câncer no mundo a cada ano é causada pelo câncer de pulmão (1,37 milhões de mortes), estômago (736.000 mortes), fígado (695.000 mortes), colorretal (608.000 mortes), mama (458.000 mortes) e câncer de colo (275.000 mortes) (WHO, 2013). No entanto, de maneira geral observa-se que está ocorrendo um aumento rápido e progressivo no número de casos de cânceres de pulmão, mama e colorretal (INCA, 2013).

A partir da década de 1970, observou-se um maior ônus global devido ao câncer, com a doença incidindo mais sobre países em desenvolvimento, principalmente aqueles com poucos e médios recursos. Nos últimos anos, a incidência do câncer tem aumentado de forma significativa fazendo com que a doença passe a ser vista no mundo como um problema de saúde pública (INCA, 2013). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2008, o câncer foi mundialmente a principal causa de morte, sendo responsável por 7,6 milhões de óbitos, representando aproximadamente 13% de todas as mortes no mundo. A OMS estima que em 2030 possa haver 27 milhões de casos de câncer, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas sobreviventes de câncer, anualmente, com câncer (INCA, 2013).

Dentre os tipos de câncer, o câncer colorretal (CCR) é o terceiro comumente diagnosticado em homens e o segundo, em mulheres, com mais de 1,2 milhões de novos casos diagnosticados a cada ano, 608.700 mortes estimadas ocorridas em 2008, sendo responsável por cerca de 8% das mortes relacionadas ao câncer (FERLAY *et al.*, 2011). Cerca de 60% dos casos ocorrem em regiões mais desenvolvidas, sendo os padrões geográficos bem semelhantes em relação ao sexo, apesar da incidência no sexo masculino ser maior na maioria das

populações em uma razão de 1,4:1 (INCA, 2013). No Brasil, o câncer colorretal representa o terceiro tipo mais incidente, tanto em homens como em mulheres (Tabela 1) (INCA, 2013).

**Tabela 1.** Distribuição dos tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
			<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	52.680	27,9%
Próstata	60.180	30,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Côlon e Reto	15.960	8,4%
Côlon e Reto	14.180	7,3%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Estômago	12.670	6,5%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Estômago	7.420	3,9%
Esôfago	7.770	4,0%			Ovário	6.190	3,3%
Bexiga	6.210	3,2%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Laringe	6.110	3,1%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%					

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: INCA, 2013.

A evolução da medicina permitiu o surgimento de uma quantidade significativa de novos fármacos para o tratamento do câncer, aumentando a sobrevida global e qualidade de vida dos pacientes (CALABRESI & CHABNER, 2012; RANG, 2008). Apesar desse avanço mais de 50% dos pacientes não respondem à terapia inicial e a doença progride para a doença metastática (CHU, 2005).

Os antineoplásicos são utilizados no tratamento de diversas neoplasias, sendo mais efetivos quando dados de forma associada com outros fármacos. Boa parte deles atua sobre o DNA na fase de síntese do ciclo celular, sendo ativos apenas sobre as células que se encontram em processo de divisão. Dentre estes fármacos estão o 5-Fluorouracil e o irinotecano, utilizados no tratamento do câncer colorretal sob a forma do protocolo FOLFIRI (5-Fluorouracil + Irinotecano + Leucovorin). (GUIMARÃES & ROSA, 2008; RANG & DALE, 2008; SALTZ *et al.*, 2001). Mais recentemente tem sido utilizado juntamente como protocolo FOLFIRI o anticorpo monoclonal bevacizumab, que bloqueia a ação do VEGF (*vascular endothelial growth factor*), impedindo o crescimento de células vasculares cancerígenas, sendo observadas vantagens em usar bevacizumab quanto à sobrevivência global e a sobrevida livre de progressão (BERETTA *et al.*, 2013; MACEDO *et al.*, 2012).

Como os agentes antineoplásicos não são específicos para as células tumorais, esses acometem, também, os tecidos normais que se proliferam rapidamente, como medula óssea,

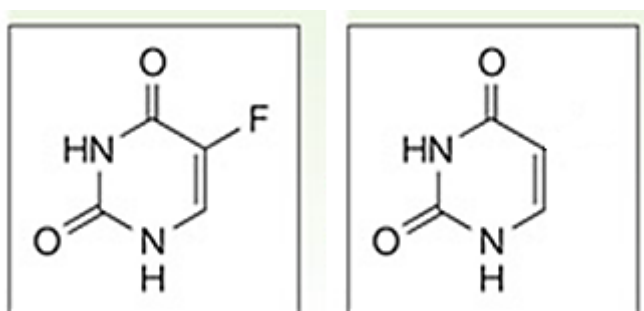
folículo piloso e epitélio do trato gastrintestinal. Assim esses tecidos estão sujeitos a uma lesão pela maioria dos agentes antineoplásicos, o que limita o uso desses fármacos (CALABRESI & CHABNER, 2012, LARA, *et al.*, 2007; RANG & DALE, 2008).

### 1.2. 5-Fluorouracil (5-FU)

O 5-Fluorouracil é um fármaco quimioterápico antimetabólito pertencente ao grupo dos análogos das pirimidinas (pirimidinas halogenadas - fluoradas) (CALABRESI & CHABNER, 2012; RANG & DALE, 2008). Desenvolvido na década de 50, o 5-FU tem sido usado para o tratamento de cânceres desde sua introdução em 1957 (KOENIG & PATEL, 1970), com o objetivo de inibir processos essenciais para as células, dentre os quais, o reparo e síntese de DNA e/ou RNA, processos essenciais para síntese e metabolismo de novas células (revisto por LONGLEY *et al.*, 2003, RUTMAN *et al.*, 1954).

O mecanismo de citotoxicidade atribuído ao 5-FU está na sua capacidade de inibir a enzima timidilato sintase (TS), envolvida no fornecimento de grupos timidilatos para o reparo e síntese de DNA (KELLY, 2007). Além disso, o flúor na posição 5 (Figura 2) permite ao 5-FU imitar bioquimicamente a uracila (nucleotídeo natural) e dessa forma interferindo na síntese ou função dos ácidos nucléicos através da incorporação de fluoronucleotídeos na molécula de DNA e/ou RNA (CALABRESI & CHABNER, 2012; revisto por LONGLEY *et al.*, 2003).

**Figura 1.** Estrutura química do 5-Fluoruracil e da uracila.

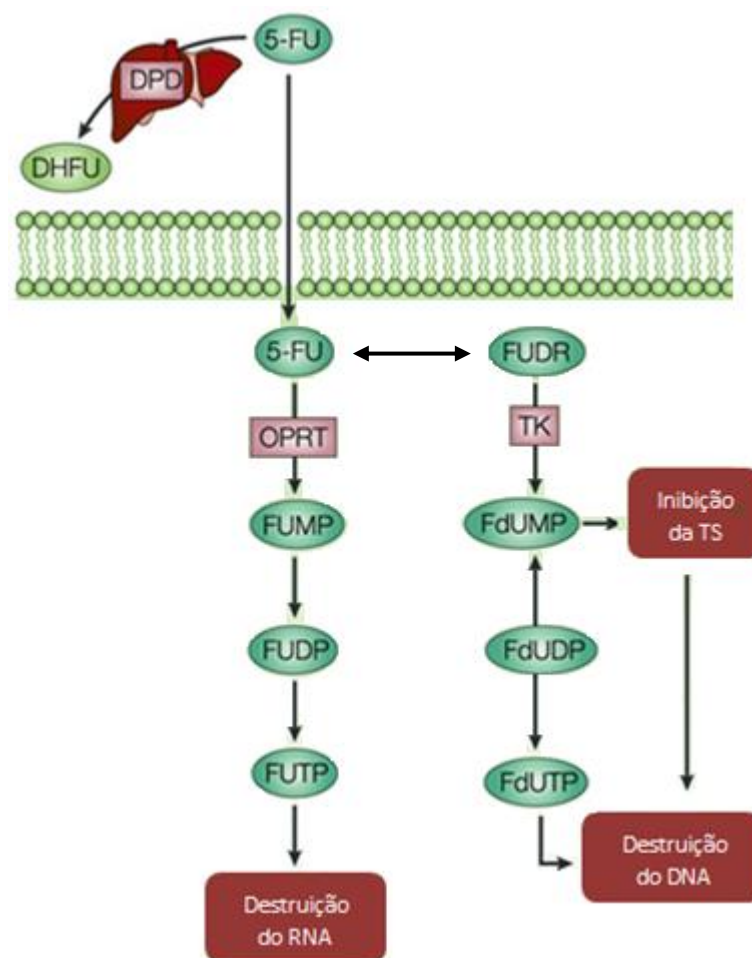


Adaptado de LONGLEY *et al.*, 2003.

Dentro das células o 5-FU é convertido em três metabolitos ativos principais que causam dano ao RNA e/ou DNA ou que irão agir sobre a enzima timidilato sintase. Dentre os

metabolitos estão: fluorodeoxiuridinamonofosfato (FdUMP) inibe a ação da Timidilatosintase, fluorodeoxiuridina trifosfato (FdUTP) agem sobre a síntese de DNA e fluorouridina trifosfato (FUTP) agem sobre a síntese de RNA. A reação limitante no catabolismo do 5-Fluorouracil é catalisada pela enzima diidropirimidinasidrogenase (DPD), que converte 5-FU em diidrofluorouracil (DHFU). Mais de 80% do 5-FU administrada é normalmente catabolizada primariamente no fígado onde a DPD é abundantemente expressa, podendo ainda ser metabolizado na mucosa intestinal, nas células tumorais e em outros tecidos (CALABRESI & CHABNER, 2012; revisto por LONGLEY *et al.*, 2003).

**Figura 2.** Mecanismo de ação do 5-Fluorouracil.



Fonte: LONGLEY *et al.*, 2003.

O 5-FU é utilizado no tratamento de uma extensa variedade de tipos de câncer como mama, trato respiratório e colorretal (CURRERI *et al.*, 1958; GUIMARÃES & ROSA, 2008), melhorando a sobrevida global e livre de progressão (IMPACT, 1995). Dependendo do tipo

de regime de administração do 5-fluorouracil, se em bolus ou em infusão contínua, o 5FU promove efeitos terapêuticos e adversos diferentes. Observou-se que, em infusão contínua, este apresenta uma maior resposta, com reduzida toxicidade gastrointestinal e hematológica, e tipicamente confere um tempo médio de sobrevida de 10-14 meses para o câncer colorretal (KOHNE, 1998).

O 5-Fluorouracil (5-FU) ainda é considerado o medicamento padrão para o tratamento do câncer de colorretal metastático, podendo ser utilizado como primeira ou segunda linha de tratamento (DOUILLARD, 2000). No entanto, conforme divulgado pelo *The Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project*, as taxas de resposta ao 5-FU sozinho são geralmente inferiores a 20%.

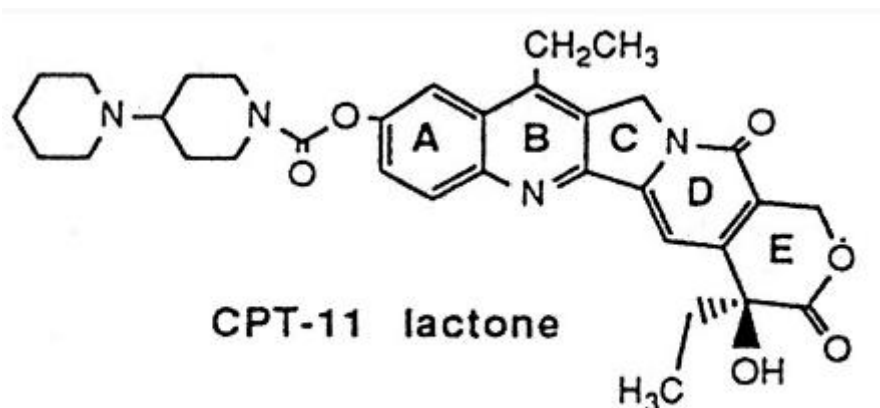
A quimioterapia à base de 5-FU, geralmente sob a forma de 5-FU acrescido de leucovorin (LV), foi uma opção para câncer de colorretal metastático. Essa combinação resultou em melhores taxas de resposta, mas não se traduziram em melhorias significativas na sobrevida em pacientes com doença metastática (JOHNSTON,2001). A combinação de 5-FU com quimioterapias mais recentes, como o irinotecano (Protocolo FOLFIRI) e oxaliplatina (Protocolo FOLFOX) melhorou as taxas de resposta para o câncer colorretal avançado para 40-50% (DOUILLARD, 2000; GIACCHETTI, *et al.*, 2000).

### **1.3. Irinotecano (CPT-11)**

O irinotecano é um sal triidratado, 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carboniloxi-camptotecina, análogo semi-sintético solúvel em água da camptotecina (DOODS *et al.*, 1998) (Figura 4). A camptotecina foi inicialmente isolada nos Estados Unidos em 1966, de uma planta nativa da China e do Tibet, *Camptotheca acuminata*. Apesar dos estudos experimentais revelarem o potencial anticâncer da camptotecina, seu uso foi limitado pela toxicidade, sendo o derivado irinotecano aprovado posteriormente para uso clínico no início na década de 1990 (ALIMONTI *et al.*, 2004).

O irinotecano é um inibidor seletivo da topoisomerase I. Essa enzima é responsável por diminuir a tensão da torção do DNA, através de ruptura reversível em uma das cadeias do DNA durante o processo de replicação. O irinotecano, assim como outras camptotecinas, evita a religação dessas fitas, levando à formação de quebras de cadeia de DNA durante a replicação, o que bloqueia a divisão celular (DOODS *et al.*, 1998; ALIMONTI *et al.*, 2004).

**Figura 3.** Estrutura química do cloridrato de irinotecano (CPT-11) lactona.



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

O irinotecano tem sido utilizado para o tratamento de uma vasta quantidade de cânceres (GUIMARÃES & ROSA, 2008). Nos últimos anos, o irinotecano tem sido usado como agente único ou combinado com outros protocolos para tratamento de primeira e segunda linha para o câncer colorretal (DOODS *et al.*, 1998; ROSATI *et al.*, 2002; CHESTER *et al.*, 2003). Além disso, tem mostrado efeitos sobre outros tipos de cânceres como o câncer de ovário (FUJII *et al.*, 2002), linfoma de Hodgkin's (RIBRAG *et al.*, 2003), pulmão (LANGER, 2004; ROCHA-LIMA *et al.*, 2007), pâncreas (ROCHA-LIMA *et al.*, 2001), mama (PEREZ *et al.*, 2004), colo de útero (IRVIN *et al.*, 1998) e de estômago (AJANI, 2005). Na década de 90, o irinotecano foi aprovado pelo FDA para ser utilizado no tratamento do carcinoma colorretal metastático que progrediu após quimioterapia padrão com 5-Fluorouracil (CUNNINGHAM *et al.*, 1998).

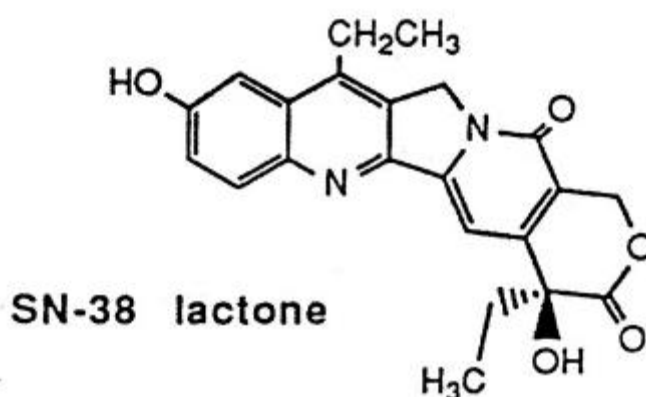
Os efeitos adversos comuns observados com a administração do irinotecano incluem diarreia, neutropenia, síndrome colinérgica precoce, náusea e vômito, alopecia e astenia. No entanto, os efeitos tóxicos dose limitantes são diarreia grave e neutropenia (CUNNINGHAM *et al.*, 1998; CHESTER *et al.*, 2003). Estudos clínicos mostram que o irinotecano causa diarreia em até 80% dos pacientes, sendo esta de graus 3 e 4 em aproximadamente 25% destes (KEEFE *et al.*, 2007). Quanto à leucopenia, o manejo é mais facilmente realizado através da administração de fatores estimuladores de colônia de granulócitos (G-CSF) (ALIMONTI *et al.*, 2004). Já quanto à síndrome colinérgica, sabe-se que ela ocorre devido à inibição da enzima acetilcolinesterase, ocasionando vômitos e diarreia acompanhada por cólicas



abdominais, sudorese e distúrbios de acomodação que geralmente são transitórios e revertidos com atropina (DODDS & RIVORY, 1999, apud MELO, 2007).

O irinotecano em si tem pouca ou nenhuma atividade *in vitro* e exerce a sua atividade anticâncer após biotransformação em seu metabolito ativo, o SN-38 (DOODS *et al.*, 1998). O irinotecano é uma pró-droga convertida em SN-38 (7- etil-10-hidroxicamptotecina) (Figura 2), pela enzima carboxilesterase (CE), particularmente CE hepática (Figura 6), sendo o SN-38 100 a 1.000 vezes mais ativo que o irinotecano (RIVORY *et al.*, 1996; CHESTER *et al.*, 2003). A CE encontra-se presente abundantemente no fígado, mas também pode ser encontrada em menor quantidade no duodeno, jejuno, íleo, cólon e reto (SATOH *et al.*, 1998). Esta enzima libera a cadeia lateral da dipiperidina presente na posição C-10 da molécula de irinotecano. Após a administração, o irinotecano tem meia vida de 13h, enquanto o SN-38, de aproximadamente 17–25 h (ALIMONTI *et al.*, 2004).

**Figura 4.** Estrutura química do SN-38 lactona.



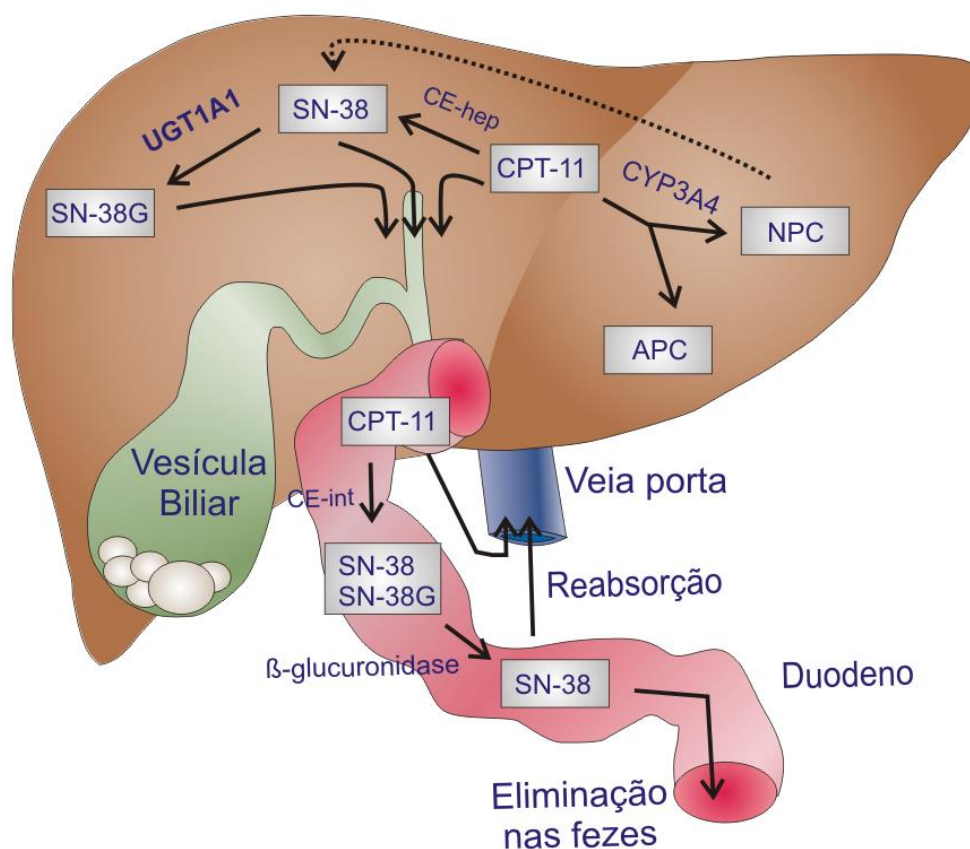
Fonte: DODDS *et al.* (1998).

Além do metabolismo do irinotecano em SN-38, o fármaco pode ser metabolizado também por enzimas hepáticas citocromo P450, principalmente CYP3A4, gerando dois metabolitos de menor atividade antitumoral: APC (7-etil-10-[4-N-(5-ácido aminopentanóico)-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina) (CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSEN *et al.*, 2004). O NPC é completamente metabolizado em SN-38 pela enzima CE (RIVORY *et al.*, 1996; DODDS *et al.*, 1998; MATHIJSEN *et al.*, 2004). Após o irinotecano ser convertido em SN-38 nos tecidos, ocorre sua conjugação com a enzima uridina difosfato glicuronosil-transferase (UDP-

GT) – UGT1A1, com a formação de SN-38 glicuronídeo (SN-38G, Figura 6), composto inativo (CHESTER *et al.*, 2003; MATHIJSEN *et al.*, 2004).

A eliminação de irinotecano é realizada principalmente através das fezes (60-70%), sendo também excretada pela bile (25%) e urina (10-20%) (ALIMONTI *et al.*, 2004). No intestino, uma parte do fármaco é reativada em SN-38 por bactérias intestinais produtoras de  $\beta$ -glicuronidases (como *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*) completando o ciclo entero-hepático do fármaco (TAKASUNA *et al.*, 1998) (Figura 6).

**Figura 5.** 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]-carboniloxicamptotecina) e NPC (7-etil-10-[4-amino-1-piperidino]-carboniloxicamptotecina). O NPC pode ser metabolizado pela carboxilesterase (CE) em SN-38. A depuração do SN-38 é feita no fígado pelo polipeptídeo A1 da família da uridina difosfato glicosiltransferase1 (UGT1A1), gerando glicuronídeos de SN-38 (SN-38G), que são desprovidos de atividade biológica. Irinotecano, SN-38 e SN-38G são excretados na bile e chegam ao intestino delgado. No intestino delgado, o irinotecano pode ser

clivado pela CE intestinal, formando mais SN-38. Além disso, o SN-38G pode ser desconjugado pela ação de bactérias intestinais produtoras de  $\beta$ -glicuronidase, transformando-se novamente em SN-38. Este, por sua vez, é reabsorvido iniciando um processo de recirculação êntero-hepática (TAKASUNA *et al.*, 1996; CHESTER *et al.*, 2003 apud Wong, 2013).

Como citado anteriormente, a ação desses antineoplásicos não se limita somente às células neoplásicas, com isso essas drogas podem atuar em células normais tendo como resultado importantes efeitos colaterais que em certas situações podem determinar desde a redução do esquema terapêutico como a sua total interrupção, assim, podendo trazer grande prejuízo na eficácia do tratamento oncológico (FILICKO *et al.*, 2003; LARA, *et al.*, 2007; CALABRESI & CHABNER, 2012). Dentre esses efeitos nosso trabalho se propõe a estudar a mucosite intestinal induzida pela associação do 5-FU com irinotecano.

#### **1.4. Mucosite Intestinal**

Mucosite do trato alimentar 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 – mucosite oral – ou mucosa intestinal – mucosite gastrointestinal). A alta prevalência de manifestações clínicas adversas como disfagia, dispepsia, diarreia, náuseas e vômitos, dor abdominal, úlceras orais e anorretais, entre outras, são resultado da pouca seletividade dos agentes antineoplásicos e da alta taxa de proliferação do epitélio do trato gastrointestinal (GIBSON & KEEFE, 2006). Qualquer região da mucosa digestiva (desde a boca ao ânus) pode ser afetada. Algumas porções são mais susceptíveis que outras à mucosite de forma precoce ou tardia e, por esta razão, o termo mucosite alimentar, mais abrangente, tem sido considerado o mais adequado para descrever o processo (SONIS *et al.*, 2004; SCULLY & SONIS, 2006).

A mucosite induzida por drogas antineoplásicas é um importante dose-limitante e dispendioso efeito colateral da terapia do câncer (SONIS *et al.*, 2004, RUBENSTEIN *et al.*, 2004). De forma geral, cerca de 15 a 40% dos pacientes em quimioterapia antineoplásica apresentam algum grau de mucosite (ELTING *et al.*, 2003; RUBENSTEIN *et al.*, 2004; ELTING *et al.*, 2007), podendo modificar a intensidade, duração e eficácia do tratamento em cerca de 50% dos casos (SCULLY; SONIS; DIZ, 2006). Quando se associa irradiação à quimioterapia em altas doses, para o transplante de células tronco hematopoiéticas, a

prevalência de mucosite atinge quase 100% dos pacientes, afetando mais de dois milhões de pessoas no mundo a cada ano (GIBSON *et al.*, 2013).

A diarreia, o sintoma mais marcante na mucosite intestinal, é observada em aproximadamente 80% dos pacientes em quimioterapia, sendo maior nos primeiros ciclos de tratamento, quando se observa diarreia de grau 3-4 (> 7 episódios de diarreia por dia havendo a necessidade de hidratação por um período superior às 24h) em até 25% dos pacientes (KEEFE *et al.*, 2007).

Dos pacientes que apresentam mucosite, 35% sofrerão um atraso nos ciclos subsequentes de quimioterapia, 60% irão requerer redução nas doses aplicadas e 30%, a descontinuação do regime de tratamento. Em geral, 60% apresentam febre e requerem hospitalização (KEEFE *et al.*, 2007). Além disso, em pacientes neutropênicos, muito em consequência da quimioterapia, a presença de mucosite representa um aumento de quatro vezes no risco de sepse (RUBENSTEIN *et al.*, 2004). O reflexo desses dados envolve o aumento da morbidade e mortalidade de pacientes com câncer. Portanto, esse efeito adverso tem o potencial de interferir diretamente na eficácia do tratamento, aumentando os custos com da terapia e apresentando um grande impacto sobre a qualidade de vida dos pacientes.

Muito tem se descoberto acerca dos mecanismos relacionados à patogênese da mucosite intestinal, muito em parte com a contribuição do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer – LAFICA, que nos últimos anos vem desenvolvendo ou aprimorando modelos experimentais de mucosite intestinal com antineoplásicos.

Nesse contexto, observou-se que a administração de irinotecano em camundongos cursa com uma significativa diarreia, com diminuição das vilosidades intestinais e perda da arquitetura das criptas. Em nossos estudos verificamos adicionalmente que a síntese de citocinas, como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC, a quimiocina análoga da IL-8 humana no camundongo, apresenta-se elevada localmente nas alças intestinais de camundongos injetados com irinotecano, e que a modulação farmacológica com talidomida ou pentoxifilina, previne significativamente o desenvolvimento das lesões intestinais (MELO *et al.*, 2008). Outro estudo experimental (LOGAN *et al.*, 2008) caracterizou as alterações morfológicas induzidas pelo irinotecano em mucosa oral (atrofia epitelial), jejuno (achatamento dos vilos e criptas) e cólon (encurtamento de criptas) de ratos, com expressão imunohistoquímica aumentada de

NF $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 na mucosa do trato gastrointestinal, sobretudo nas horas seguintes à administração do irinotecano.

Adicionalmente, foi estudado o papel de diversas citocinas e do óxido nítrico (NO) na patogênese da mucosite intestinal induzida diferencialmente por diversos quimioterápicos, tais como Metotrexato (LEITÃO *et al.*, 2011), Irinotecano (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012) e 5-fluorouracil (SOARES, 2008). Dessa forma, demonstramos que na mucosite intestinal por irinotecano, citocinas como a interleucina 18 (IL-18) e o TNF- $\alpha$ , parecem aumentar a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida com consequente formação de NO, o qual parece gerar intermediários reativos como o radical peroxinitrito, que possivelmente é o mediador final da lesão da mucosa observada em camundongos injetados com irinotecano.

Tal demonstração foi possível mediante bloqueio farmacológico da ação da IL-18, por meio da administração sistêmica da proteína ligante da IL-18 (IL-18bp) e por meio da deleção gênica em camundongos para a IL-18 (LIMA-JÚNIOR, 2008). Nesses animais, verificou-se que a atividade de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é reduzida, portanto, com menor síntese de NO. A repercussão da modulação da ação da IL-18 envolveu a redução de danos funcionais (diarreia e hipercontratilidade intestinal, análoga à cólica evidenciada por pacientes), inflamatórios (detectado pelo aumento de infiltrado neutrofílico) e estruturais no intestino (redução da altura de vilosidades, hiperplasia de criptas, apoptose e vacuolização celular) (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Adicionalmente, o uso do infliximabe, um anticorpo monoclonal para TNF- $\alpha$ , reduziu de maneira importante a expressão de iNOS, detectada por western blot (FIGUEIREDO, 2012). De maneira complementar, a participação do NO, neste modelo de toxicidade, foi investigada em animais *knockout* para iNOS ou tratados com aminoguanidina, um inibidor de iNOS, os quais apresentaram reduzidos danos intestinais de modo similar aos achados experimentais descritos para a modulação da ação da IL-18 (LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Entretanto, nenhum dos parâmetros de lesão estudados na mucosite do irinotecano foi modulado em animais *knockout* para receptores de PAF (PAFR) ou para 5-lipoxigenase.

Outras citocinas da família da IL-1 parecem estar relacionadas à mediação da mucosite intestinal. O envolvimento da caspase-1, enzima que converte a pró-IL-1, a pró-interleucina 18 (IL-18) e a pró-interleucina 33 (IL-33) em suas formas ativas, na patogênese da mucosite

intestinal induzida por irinotecano, foi demonstrada em camundongos, visto que há atenuação dessa toxicidade em animais *knockout* para caspase-1 (LIMA-JUNIOR, 2008).

A IL-33, descrita como membro da família de IL-1 (SCHMITZ *et al.*, 2005), parece estar relacionada com o desenvolvimento de uma resposta biológica moduladora, mas sua participação como mediador na mucosite intestinal ainda não está plenamente estabelecida. Lima-Júnior (2008) sugeriu, para a mucosite intestinal, um efeito protetor.

Com relação às alterações histopatológicas foram realizados estudos em amostras de mucosa duodenal, obtida por endoscopia seriada em pacientes em quimioterapia a base de Irinotecano. Keefe *et al.*, (2000) demonstraram que corpos apoptóticos são visíveis nas vilosidades intestinais a partir das primeiras 24 horas após a quimioterapia, o que precede o subsequente achatamento das vilosidades e diminuição da área absorptiva com diminuição do índice mitótico nas criptas. Adicionalmente, a análise temporal feita pelos experimentos de um grupo australiano comandado por Dorothy Keefe, também mostrou alterações tardias de perda de fibras de colágeno tipo IV em mucosa jejunal e colônica nas fases tardias (96h e 144h) do tratamento com irinotecano (AL-DASOOQI *et al.*, 2011). Não há, até este momento, certeza se as alterações da função intestinal são plenamente recuperadas ou se há alterações de longo prazo.

Tem-se demonstrado, também, que a mudança na microbiota intestinal tem correlação com a toxicidade do Irinotecano. Brandi *et al.* (2006) mostraram que camundongos *germ-free* foram mais resistentes à toxicidade do irinotecano que o grupo holoxênico (aquele com a microbiota íntegra) (BRANDI *et al.*, 2006). Nesse contexto, Stringer *et al.*, (2007) evidenciaram que o irinotecano causou mudanças na flora do estômago, jejuno, cólon e fezes de ratos, e essas mudanças foram associadas ao desenvolvimento de diarreia. Essas alterações na flora podem favorecer uma infecção sistêmica e, em particular, podem contribuir para o desenvolvimento da mucosite intestinal. Além disso, os autores evidenciaram que as bactérias produtoras de  $\beta$ -glicuronidase encontraram-se aumentadas após a quimioterapia do irinotecano, reativando o SN38 a partir do SN-38 conjugado ao ácido glicurônico (SN38G), causando um dano na mucosa intestinal e diarreia (STRINGER *et al.*, 2007). Estudos com a combinação dos antibióticos Neomicina e Bacitracina têm demonstrado potencial efeito protetor na mucosite induzida por irinotecano (SCHMITTEL *et al.* 2004) e Fluorouracil associado com Irinotecano (ALIMONTI *et al.* 2003).

Nosso grupo demonstrou mais recentemente que o irinotecano é capaz de induzir um significativo dano sobre o trato gastrointestinal, que se correlaciona diretamente com as alterações funcionais, detectadas pelo teste de permeabilidade e de perfusão intestinal de açúcares e íons (WONG, 2013). Verificou-se, também, a presença de translocação bacteriana para órgãos periféricos como, por exemplo, o fígado, no curso da lesão intestinal induzida pelo irinotecano. Ao que se observou no estudo, a deficiência de receptores *Toll-like* do tipo 2, assim como da proteína adaptadora MyD88 envolvida na sinalização de receptores *Toll*, previne o desenvolvimento do dano intestinal e da diarreia. Contudo, a deficiência dos receptores NOD1 e TLR9 somente melhora respectivamente a diarreia e o processo inflamatório, relacionados ao irinotecano.

Em outro modelo de mucosite intestinal, demonstrou-se que a expressão de IL-1Ra (Antagonista do receptor de IL-1) está elevada temporariamente na mucosa intestinal e na circulação durante a mucosite intestinal induzida por 5-FU e que a administração desse antagonista após a realização da quimioterapia reduz a toxicidade aguda letal e a lesão da mucosa intestinal, aumenta a recuperação intestinal, previne a perda de peso e diminui a diarreia severa (WU *et al.*, 2010). Outro estudo dos mesmos autores demonstrou ainda que a administração de 5-FU induz apoptose intestinal e que a administração de IL-1Ra reduz a apoptose nas criptas do intestino delgado (WU, 2011). Adicionalmente, o tratamento de camundongos com 450 mg/kg, i.p. de 5-FU diminuiu a razão vilos/cripta do duodeno, aumentou a atividade de mieloperoxidase e aumentou a concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC em comparação aos animais tratados apenas com salina (SOARES, 2008, SOARES *et al.*, 2011). Além disso, o mesmo estudo utilizando animais *knockout* para o receptor de PAF e animais tratados com o antagonista do receptor de PAF mostrou que o dano intestinal dependente de 5-FU foi diminuído e a redução da razão vilos/cripta foi atenuada. No entanto, a atividade de MPO não foi afetada, apesar de serem diminuídos os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e KC (SOARES *et al.*, 2011).

Outro estudo do nosso grupo de pesquisa investigou o papel da citocina IL-4 na patogênese da mucosite intestinal induzida por 5-FU, mostrando que a utilização de animais *knockout* para IL-4 reduziu o dano intestinal (não reduziu a razão vilos/cripta) causado pelo agente mucotóxico. Além disso, não houve aumento da atividade de MPO e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CXCL-8 (SOARES *et al.*, 2013). Em adição, os animais *knockout* para IL-18 administrados com 5-FU (450mg/Kg)

apresentaram leucopenia, dano intestinal com encurtamento dos vilos e aprofundamento das criptas.

Tais observações com relação a IL-Ra, PAF, IL-18 parecem ser fortemente indicativas de que o curso de desenvolvimento da mucosite parece ser dependente do tipo de quimioterápico antineoplásico usado na sua indução, percebido quando confrontados os dados de LIMA-JÚNIOR (2008), para o irinotecano, e SOARES (2008), para o 5-fluorouracil. Assim faz-se necessário a combinação desses quimioterápicos para simular de maneira mais fidedigna o curso da mucosite intestinal, como observado na prática clínica.

### **1.5. Diarreia induzida por quimioterapia**

Quando se trata de mucosite gastrointestinal, um dos sintomas comuns é a diarreia, que está associada ao aumento na frequência de evacuações e diminuição da consistência das fezes (GIBSON & KEEFE, 2006; STRINGER *et al.*, 2007). Tanto a quimioterapia como a radioterapia pode causar diarreia, que além de piorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes, também podem levar a interrupções dos protocolos de tratamento e significativo aumento dos custos devido ao maior tempo de internação e uso de medidas adjuvantes (BOWEN *et al.*, 2007; GIBSON *et al.* 2013).

A diarreia pode ser classificada em 4 tipos de acordo com os mecanismos subjacentes: Diarreia osmótica, secretória, exsudativa ou por distúrbio de motilidade. No entanto, muitas vezes a diarreia é uma combinação desses mecanismos (DANI, 2006). A diarreia osmótica pode ser causada pela excessiva ingestão ou absorção diminuída de solutos hidrossolúveis, os quais retêm água e eletrólitos no lúmen intestinal (DANI, 2006; FIELD, 2003). Este tipo de diarreia pode ocorrer após a ingestão de solutos pouco absorvíveis, tais como, lactulose, sorbitol ou magnésio, ou como resultado de um déficit absorptivo, como em pacientes com intolerância a lactose ou aqueles com doença celíaca. A diarreia secretória resulta de uma sobre estimulação da capacidade secretória intestinal. Certos estímulos tais como, enterotoxinas bacterianas, ácido biliar, mediadores inflamatórios e hormônios gerados pelos tumores neuroendócrinos podem causar a diarreia secretória (DANI, 2006; FIELD, 2003). A diarreia exsudativa é causada pelo rompimento do epitélio intestinal, levando à perda de água e eletrólitos, muco, proteínas, e algumas vezes perdas células incluindo hemácias e leucócitos, de vasos sanguíneos e linfáticos. O distúrbio da motilidade pode também resultar em diarreia.

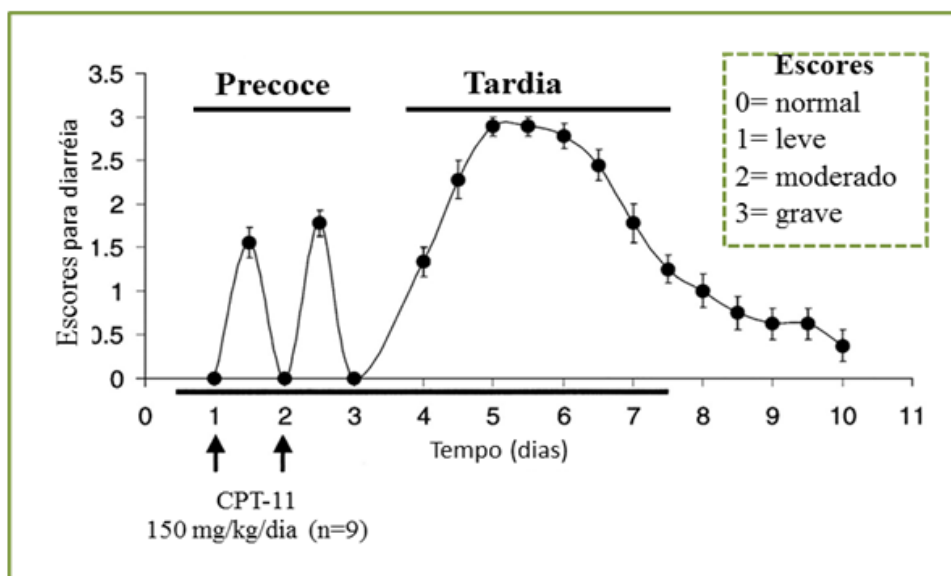


O aumento da motilidade intestinal reduz o tempo para absorção e aumenta o volume das fezes. Em relação à diarreia induzida pela quimioterapia, incluindo o irinotecano, parece ter um componente primariamente secretório, e um componente exsudativo (DANI, 2006; apud WONG, 2013)

Os protocolos de quimioterapia causam diarreia em diferentes graus, particularmente aqueles contendo 5-fluorouracil (5-FU) e irinotecano. Apesar da maioria dos estudos realizados para elucidar os mecanismos envolvidos na gênese da diarreia terem se concentrado no irinotecano, sabe-se que ocorre diarreia importante com uma incidência alta variando de 50-80% quando ambos, irinotecano e 5-fluorouracil, são administrados conjuntamente (GIBSON & KEEFE, 2006). Dentre estes, o irinotecano que é uma droga comum e eficaz utilizada no tratamento de câncer gastrointestinal provoca duas formas de diarreia: uma diarreia colinérgica precoce e uma diarreia tardia grave, que pode causar interrupções no tratamento (GIBSON *et al.* 2007).

A diarreia induzida pelo irinotecano é constituída de duas fases: uma fase inicial, que ocorre até 24h após o tratamento com esse antineoplásico pelo fato da droga aumentar a atividade colinérgica, pois o irinotecano inibe a acetilcolinesterase, 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 (Figura 2) (RUBEINSTEIN *et al.*, 2004; TRIFAN *et al.*, 2002; apud WONG, 2013).

**Figura 6.** Fases da diarreia associada ao irinotecano



Fonte: TRIFAN *et al.* (2002) adaptado por WONG, 2013.

### 1.6. Modelos para estudo da mucosite

Um problema adicional a ser contornado quando se estuda a mucosite gastrointestinal é a dificuldade para obtenção de amostras de locais dentro do TGI de pacientes via endoscopia. Portanto, a fim de obter dados a partir desse local anatômico, os modelos animais são necessários. Além disso, qualquer novo potencial agente antitumoral deve ser submetido primeiro a rigorosos testes em animais para comprovar a eficácia e segurança antes do início de ensaios clínicos.

Os modelos utilizando 5-Fluorouracil, se iniciaram na década de 60 utilizando ratos (BALLERINI, 1961). Em 1979, Vidon e colaboradores estudaram o movimento de água e eletrólitos através da mucosa de ratos em que foi administrada uma injeção única intramuscular de 40 mg/kg de 5-Fluorouracil (VIDON, 1979). Estudo do mesmo autor mostrou que o 5-fluorouracil causou mudanças na estrutura da mucosa intestinal (VIDON, 1981). Outras pesquisas que estudavam a inibição da cicatrização do cólon causada por 5-Fluorouracil em ratos utilizaram doses menores de 5-Fluorouracil: 20 mg/kg (WEIBER, 1994) e 5 mg/ml ou 1 mg/ml (GRAF, 1994). Chen realizou estudo utilizando a dose de 150 mg/kg de 5-Fluorouracil dada em ratos intraperitonealmente para avaliar a atividade inflamatória (CHEN, 1997).

Um estudo realizado em 2009 teve como objetivo determinar se as alterações que ocorrem no TGI seriam diferenciadas de acordo com o tipo de droga mucotóxica utilizada. Utilizaram-se ratos que receberam doses únicas de metotrexato (1,5 mg/kg por via intramuscular) ou 5-fluorouracil (150 mg/kg por via intraperitoneal). Os ratos foram sacrificados em tempos diferentes (30min a 72 h) seguido da coleta de amostras de intestino para análise histopatológica e imunohistoquímica para NF- $\kappa$ B, TNF, IL-1e IL-6. Ambos MTX e 5-FU provocaram lesão intestinal, bem como alterações na expressão de NF- $\kappa$ B e citocinas pró-inflamatórias específicas. Este estudo, no entanto, demonstrou que houve diferenças na distribuição de alterações histológicas, assim como o tempo e a intensidade da expressão tecidual das citocinas pró-inflamatórias dependendo do fármaco utilizado, concluindo que existem diferenças na fisiopatologia da mucosite causada por diferentes drogas. Isso pode ter implicações importantes para o manejo clínico da mucosite (LOGAN *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos com mucosite intestinal causada por irinotecano foram realizados por Ikuno *et al.*, que utilizou a dose de 100 mg/kg de irinotecano intraperitoneal diariamente por 4 dias. Estudos preliminares indicaram que a diarreia foi induzida em camundongos aproximadamente no sexto dia após a administração de irinotecano. Além disso, esse quimioterápico induz apoptose e causa má absorção de água e eletrólitos, desta forma sugerindo que isso contribui para a indução de diarreia (IKUNO *et al.*, 1995).

No mesmo ano, Takasuna e colaboradores investigaram os mecanismos pelos quais o irinotecano induz diarreia. O autor utilizou irinotecano em ratos nas doses de 80 mg/kg, i.v. que induziu diarreia aquosa 1 hora após administração e que foi parcialmente inibida pela administração de atropina. Além disso, utilizou ainda a dose única de 60 mg/kg intravenoso que induziu alterações histopatológicas, enquanto quatro doses consecutivas de 60 mg/kg induziram diarreia entre o quinto e sétimo dia associada com a perda de integridade intestinal (TAKASUNA *et al.*, 1995). Esse último protocolo também foi utilizado em outro estudo do mesmo autor que observou que a inibição da atividade de beta-glicuronidase da microflora intestinal tem efeito protetor sobre a mucosite em ratos (TAKASUNA *et al.*, 1996).

Ainda na década de 90, Keefe e colaboradores desenvolveram um modelo de mucosite intestinal utilizando ratos da espécie dark agouti (DA) (Keefe, 1998). Este modelo é importante, pois foi capaz de simular as mudanças que ocorrem no trato gastrointestinal do ser humano após a quimioterapia. Sua principal vantagem é o uso de tumor, que permite a

simultânea avaliação da evolução tumoral (revisto por BOWEN *et al.*, 2011) quando do uso de fármacos potencialmente protetores contra a mucosite.

Outro estudo importante foi realizado por Kurita que utilizou uma dose total de 240 mg/kg de irinotecano administrado pela via intravenosa sendo 60mg/Kg a dose diária administrada em diferentes esquemas. Observou-se que a dose dada de uma única vez, induziu uma diarreia grave se comparada ao esquema de dose dados duas vezes ao dia (30 mg/Kg) sugerindo que a duração da exposição de ambos irinotecano e seu metabolito ativo estão intimamente relacionada à incidência e gravidade da diarreia induzida pelo quimioterápico (KURITA *et al.*, 2000).

Outro estudo realizado pelo grupo de Keefe utilizou também animais com tumor de mama, ratos foram tratados com doses de 100, 150 ou 200 mg/kg de irinotecano ou veículo diariamente por dois dias e sacrificados às 6, 24, 72 ou 96 horas após a administração do fármaco sendo analisada a apoptose e realizada a análise morfométrica no intestino delgado e grosso e análise histopatológica. O estudo mostrou que a hipoplasia das criptas é dose dependente e que o pico de apoptose ocorre às 6 horas pós quimioterapia (GIBSON *et al.*, 2003).

Apesar dos avanços acerca da fisiopatologia da mucosite intestinal, o sucesso em modelos animais nem sempre reproduz a clínica da doença, o que pode ser devido a uma variedade de problemas, como: 1) Nem sempre se consegue reproduzir no animal as condições do paciente, como no modelo de mucosite oral em que é necessário lesar a bochecha do hamster com agulha ponta romba para que este passe a apresentar mucosite; 2) São também importantes as doses e os protocolos de indução da mucosite, uma vez que as doses usadas em animais são muito superiores às utilizadas na prática clínica de tal forma a induzir a patologia em 100% dos animais, o que não é observado nas condições clínica, visto que nem todos os pacientes apresentam a toxicidade; 3) Existem diferenças de susceptibilidade de cada espécie; 4) A via de administração pode variar; 5) O uso de animais desprovidos de tumores nos quais é induzida a toxicidade; 6) Diferenças farmacocinéticas relacionadas ao sexo, por exemplo, que alteraria a metabolização/eliminação dos fármacos. No entanto mesmo com essas limitações, os modelos animais são importantes, pois acrescentam informações imprescindíveis ao estudo da mucosite intestinal (revisto por BOWEN *et al.*, 2011).

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, tem-se observado um aumento significativo na incidência de câncer em todo o mundo. Por outro lado, o número de agentes antineoplásicos também cresce exponencialmente, permitindo um aumento da sobrevida e recuperando qualidade de vida dos pacientes com diversos tipos de câncer.

Apesar dos avanços na oncologia, sabe-se que esses agentes não atuam especificamente sobre células tumorais, fazendo com que os pacientes passem a sofrer inúmeros efeitos adversos limitantes. Dentre esses efeitos, a mucosite intestinal é um dos principais problemas clínicos em oncologia, causado pela quimioterapia e/ou radioterapia (BOWEN *et al.*, 2011). Esses efeitos comprometem a sobrevida dos pacientes e podem prejudicar o sucesso terapêutico, pois são frequentes os atrasos em ciclos de tratamento subsequentes, reduções de doses e baixa aderência por parte dos pacientes (SONIS *et al.*, 2004) e, conseqüentemente, traz também custos adicionais com o seu tratamento (BOWEN *et al.*, 2011).

Muito se tem descoberto sobre os mecanismos e mediadores envolvidos nos efeitos colaterais da quimioterapia. No entanto, apesar dos avanços na compreensão e no tratamento de alguns desses efeitos, outros ainda permanecem pouco compreendidos, como a mucosite intestinal, cujo tratamento ainda hoje se resume predominantemente a analgésicos, antimicrobianos, antidiarreicos e uso de protetores de mucosa (BOWEN, *et al.*, 2011; SONIS, 2004). Isso ocorre também devido à lacuna no que concerne a existência de bons modelos pré-clínicos para o estudo da mucosite (FILICKO *et al.* 2003).

Um problema no estudo da mucosite intestinal é a dificuldade na obtenção de amostras, que é atualmente contornado com a utilização de modelos de mucosite gastrointestinal em animais. Esses modelos são importantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos na MI e também para testar possíveis agentes antimucotóxicos (agentes tóxicos para a mucosa) antes dos estudos clínicos. Esses modelos se aproximam ao que acontece em humanos na prática clínica e já permitem gerar informações sobre os mecanismos envolvidos na MI, o que é importante para uma possível modulação farmacológica do processo (BOWEN, *et al.*, 2011).

Como hoje ainda não se dispõe de meios efetivos para amenizar os efeitos da mucosite, na maioria dos casos, os pacientes ainda sofrem com sintomas desconfortáveis, com o maior risco de sepse e com a possível redução da eficácia do tratamento oncológico devido a atrasos e reduções de doses (BLIJLEVENS *et al.*, 2007; KEEFE *et al.*, 2007; FREITAS, 2007).

Nosso laboratório vem se dedicando nos últimos anos a estudar os mecanismos e mediadores envolvidos na patogênese da mucosite intestinal experimental. Nesse contexto, tem estudado modelos experimentais de mucosite intestinal induzida por fármacos individuais como 5-FU, irinotecano e metotrexato. Um modelo experimental de mucosite intestinal induzida por 5-FU associados a outros fármacos ainda não foi demonstrado na literatura e este dado é relevante, pois esse fármaco é comumente utilizado em associação na prática clínica. Dentre exemplos desses protocolos estão os protocolos: FOLFIRI, composto por irinotecano, 5-fluorouracil e leucovorin, e IROX, composto por irinotecano e oxaliplatina. Assim, o modelo onde a mucosite fosse induzida pela associação de irinotecano e 5-FU como ocorre no protocolo FOLFIRI (protocolo quimioterápico mais utilizado no tratamento do câncer coloretal) representaria mais fielmente o que ocorre clinicamente e poderia trazer informações mais fidedignas sobre a mucosite intestinal causada por esses fármacos, logo a proposta do nosso estudo foi a padronização deste novo modelo experimental.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Padronizar um novo modelo experimental de mucosite intestinal induzida pela associação de Irinotecano e 5-Fluorouracil em camundongos C57BL/6.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de Irinotecano (CPT-11) e 5-Fluorouracil (5-FU) em camundongos C57BL/6 por meio da análise da taxa de mortalidade, curva ponderal, parâmetros histopatológicos (através de escores microscópicos e morfometria) e parâmetro funcional (diarria).
- Estudar a participação de alguns mediadores inflamatórios envolvidos na mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano (CPT-11) e 5-Fluorouracil (5-FU) como as citocinas TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6.
- Analisar o efeito da associação de Irinotecano (CPT-11) e 5-Fluorouracil (5-FU) sobre o leucograma dos camundongos C57BL/6.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Equipamentos e instrumentos laboratoriais

- Agitador Vortex – Cetomart MV
- Autoclave
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Balança Analítica Marte AI200
- Banho-Maria BM100, Fanem
- Câmera de contagem Neubauer
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R
- Contador de Células
- Deonizador de água Mili-Q, Millipore
- Espectrofotômetro de placas - ELISA ELX800, Biotek
- Espectrofotômetro UV-VIS,
- Freezer -80°C, Thermo Scientific
- Homogeneizador de tecidos Ultra-turrax T8
- Lâmina lisa para microscopia 26 x 76 mm
- Lamínula 24 x 32 mm
- Material cirúrgico
- Medidor de pH, Hanna Instruments HI 8519N
- Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000 µL
- Micropipeta Multicanal Gilson 200 µL
- Pipetas sorológicas de 1, 5 e 10 mL
- Placa estéril de 96 poços
- Tubos de Falcon 15 e 50 mL

### 4.2. Fármacos, soluções e corantes

#### 4.2.1. Fármacos

- Cloridrato de Irinotecano (Evoterin®, frasco-ampolas 5mL, 100mg/mL, Evolabis)
- 5-Fluorouracil (5-Fluouracila, frasco ampola 10mL, 250mg/mL, Eurofarma®)



- Tribromo

#### **4.2.2. Soluções**

- Avidina-Peroxidase (Dako)
- Água destilada
- Água Mili-Q
- Álcool 70%
- Diaminobenzidina - DAB (Dako)
- Dimetil Sulfóxido (DMSO) a 100% (Merck)
- Peróxido de Hidrogênio 30% (Sigma)
- Salina tamponada com fosfato (PBS)
- Solução salina estéril (NaCl 0,9%)
- Tampão fosfato de potássio
- Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)

#### **4.2.3. Corantes**

- Hematoxilina (Merck)
- Eosina (Merck)

### **4.3. Animais utilizados nos protocolos experimentais**

Utilizaram-se camundongos C57BL/6 (n=5-6/grupo), machos, pesando entre 20 e 25 g, provenientes do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Todos os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, sob condições adequadas de luz num ciclo de 12h claro/12h escuro, em um ambiente com temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , com livre acesso a água e ração padrão *ad libitum*.

### **4.4. Aspectos éticos**

Os protocolos foram desenvolvidos de acordo com os Padrões de Uso de Animais de Laboratório da UFC. A pesquisa foi previamente submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa

Animal da Universidade Federal do Ceará – CEPA e aprovado de acordo com o protocolo CEPA nº 76/2011.

#### **4.5. Modelo experimental de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-FU**

O modelo descrito neste trabalho baseia-se no modelo de mucosite intestinal induzida por irinotecano desenvolvido por Ikuno *et al.*, (1995) e adaptado por Melo, (2007) e Lima-Júnior, (2008) no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da UFC.

Inicialmente, realizou-se um estudo piloto com o objetivo de se escolher as doses que induzissem alterações consistentes nos parâmetros de diarreia, taxa de mortalidade e massa corpórea com o mínimo de letalidade. Após o início dos protocolos experimentais, os animais foram pesados diariamente para construção da curva ponderal. Além disso, foi avaliado diariamente o grau de diarreia através de escores de 0 a 3.

##### **4.5.1. Protocolos de indução e grupos experimentais**

Os protocolos de tratamento para indução de mucosite intestinal foram realizados através da utilização de uma associação entre Irinotecano e 5-FU. Esses fármacos foram administrados por quatro dias consecutivos, obedecendo-se o intervalo de 1 hora entre os dois fármacos no grupo injetado com a associação em camundongos C57BL/6. Esses animais foram escolhidos, pois permitiriam estudos futuros com animais knockout.

Os grupos experimentais foram:

- **Grupo A:** controle saudável tratado com salina 0,9% (100µL, i.p.). Este grupo foi constituído por animais que não foram submetidos à mucosite intestinal.
- **Grupo B:** Receberam a associação de irinotecano e 5-FU: 1. 30 mg/Kg, i.p. de irinotecano + 50 mg/Kg, i.p. de 5-FU. 2. 30 mg/Kg, i.p. de irinotecano + 25 mg/Kg, i.p. de 5-FU. 3. 45 mg/Kg, i.p. de irinotecano + 25 mg/Kg, i.p. de 5-FU. 4. 45 mg/Kg, i.p. de irinotecano + 37,5 mg/Kg, i.p. de 5-FU.
- **Grupo C:** Receberam irinotecano (30 ou 45 mg/Kg, i.p.).
- **Grupo D:** Receberam 5-FU (25, 37,5 ou 50 mg/Kg, i.p.)

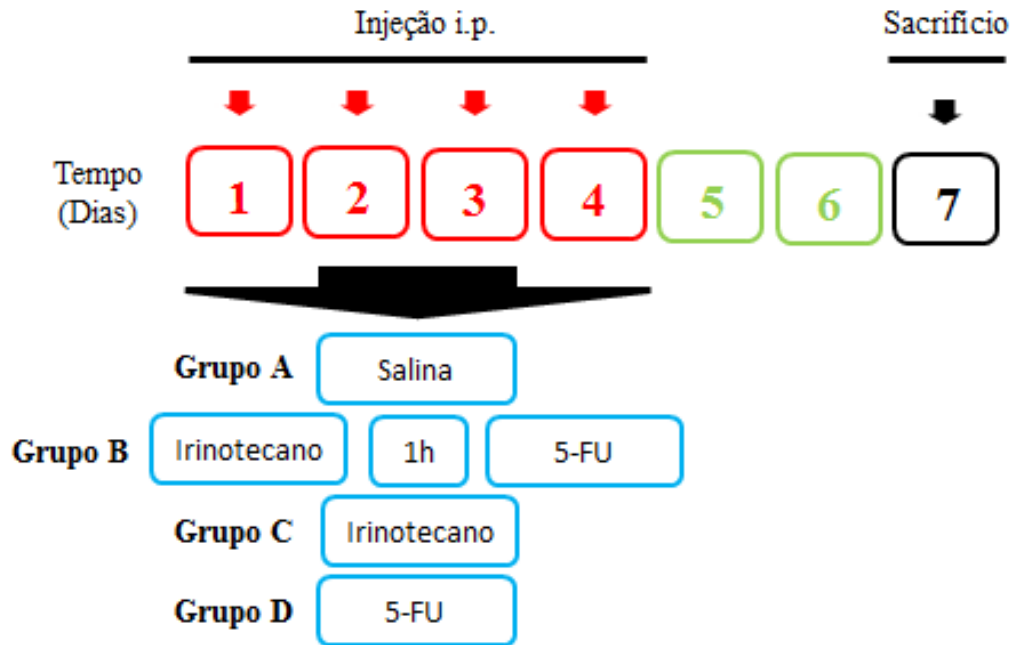
#### **4.5.2. Modelo padronizado de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-FU**

No modelo padronizado de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-FU, os grupos experimentais foram: Os animais foram tratados com Irinotecano (45mg/Kg, i.p.) e 5-Fluorouracil (37,5mg/Kg, i.p.), administrados separadamente ou de forma concomitante durante quatro dias consecutivos, realizando as aplicações sempre no mesmo horário, respeitando também um intervalo de 1 hora entre as duas drogas ou com solução salina 0,9% (100µL), por via intraperitoneal (i.p) durante quatro dias consecutivos (Figura 7). Esta via foi escolhida por ser a mesma utilizada nos tratamentos com humanos.

O sacrifício dos animais foi realizado no 7º dia após o início da indução. Antes da eutanásia, amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com a utilização de capilar heparinizado e, em seguida, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para coleta de amostras de duodeno, jejuno, íleo e cólon. Essas amostras foram pesadas e congeladas a -80°C para realização dos ensaios subsequentes.

A escolha do 7º dia para o sacrifício baseou-se no fato do aparecimento da diarreia ter início no sexto dia, sendo no sétimo dia o maior pico de diarreia e a maior perda de massa corpórea, demonstrando a presença de um processo patológico severo. Além disso, a partir do oitavo dia experimental tem-se um aumento da taxa de mortalidade até o nono dia, no qual essa taxa é de 100%.

**Figura 7.** Protocolo para indução de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-FU.



Camundongos C57BL/6 receberam injeções por via intraperitoneal, de irinotecano (45mg/Kg), 5-Fluorouracil (37,5mg/Kg), ou salina (5mL/kg), por quatro dias consecutivos, respeitando-se o intervalo de 1 hora entre os dois fármacos quando administradas concomitantemente. O sacrifício dos animais foi realizado no 7º dia após a primeira administração do antineoplásico.

## 4.6. Avaliação dos parâmetros gerais da mucosite intestinal

### 4.6.1. Taxa de mortalidade

A taxa de mortalidade foi avaliada através da observação diária dos animais desde o início da indução da mucosite até o dia do sacrifício. Posteriormente os dados foram plotados em tabelas e gráficos.

### 4.6.2. Análise ponderal

A massa corpórea dos animais foi medida em gramas (g) diariamente desde o início da indução da mucosite até o dia do sacrifício (sétimo dia). Os valores encontrados foram expressos em % de variação da massa corpórea, em relação à massa inicial e plotados em uma curva ponderal. O 100% é o valor do peso inicial do animal mensurado no primeiro dia de experimento.

### 4.6.3. Avaliação dos escores de diarreia

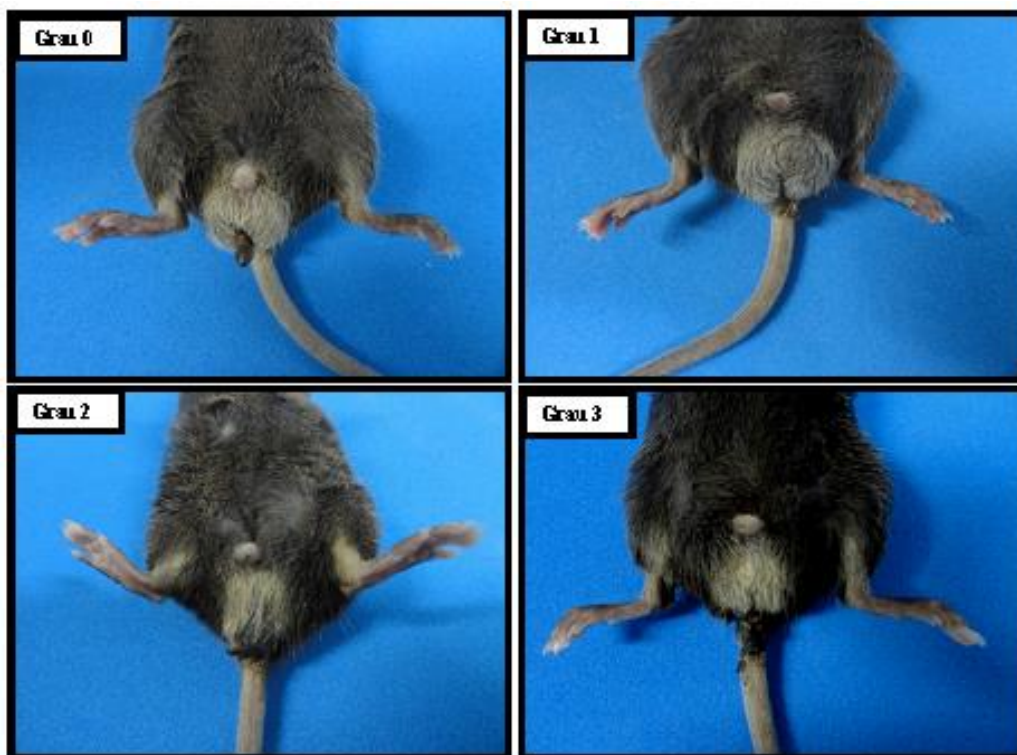
Os eventos diarreicos apresentados após o início da indução da mucosite com irinotecano e 5-FU foram avaliados diariamente utilizando os escores (segundo proposta de Kurita *et al.*, 2000) e descritos a seguir: 0 = fezes com aspecto normal; 1 = fezes levemente alteradas, pouco umedecidas; 2 = fezes úmidas com pouca sujidade perianal; 3 = fezes úmidas com bastante sujidade perianal. Esse parâmetro representa um indicativo de indução da mucosite, tendo em vista a associação do sinal diarreia à mucosite, observada na prática clínica (Figura 8).

**Tabela 2.** Escores de avaliação da diarreia em camundongos

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

Fonte: Kurita *et al.*, 2000

**Figura 8.** Representação dos graus de diarreia de acordo com escores de intensidade, pós-injeção de Irinotecano e 5-FU em camundongos C57BL/6.



A avaliação da diarreia foi realizada através de escores atribuídos 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.

#### **4.6.4. Avaliação do parâmetro hematológico**

Os animais foram levemente anestesiados com éter etílico para coleta de 20 $\mu$ L de sangue pelo plexo orbital. Esta amostra foi diluída imediatamente em 380 $\mu$ L 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 5-FU no que concerne ao número total de leucócitos circulantes. Essa observação servirá como controle da atividade do irinotecano e 5-FU sobre o animal.

Os resultados foram expressos como número total de leucócitos contados nos 4 campos da câmara de Neubauer e posteriormente multiplicados pelo fator de correção da câmara de Neubauer. Por fim, os valores foram expressos como n $^{\circ}$ células/mm $^3$ . Além da

contagem total, foi realizada a contagem diferencial dos leucócitos através de esfregaço sanguíneo previamente corado com panótipo rápido.

#### 4.6.5. Análise histopatológica e morfometria da mucosa intestinal

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, foram removidos segmentos de 0,5 cm do duodeno, jejuno, íleo e cólon dos camundongos. 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 do intestino delgado e do cólon envolveu a observação do aspecto de vilosidades e criptas, bem como presença e intensidade do infiltrado inflamatório (microscopia óptica 400x). O grau e a gravidade da mucosite foram determinados de acordo com o sistema de escores proposto por WOO *et al.* (2000), 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%), as vilosidades encontram-se encurtadas e ocorre variável hipertrofia e hiperbasofilia nas criptas remanescentes; 4 = semelhante a 3, entretanto, é mais extensa com perda da arquitetura das criptas e encurtamento das vilosidades.

**Tabela 3.** Escore de análise histopatológica para intestino delgado

<b>ESCORE</b>	<b>ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA</b>
<b>Escore 0</b>	Ausência de lesão
<b>Escore 1</b>	Menos de 10% das criptas contêm células necróticas.
<b>Escore 2</b>	Mais de 10% das criptas contêm células necróticas, mas a arquitetura permanece intacta.
<b>Escore 3</b>	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;
<b>Escore 4</b>	Semelhante a 3, entretanto, é mais extensa com perda da arquitetura das criptas e encurtamento dos vilos.

A análise morfométrica, tem por objetivo obter a medida de vilosidades, considerada desde o ponto de encontro entre duas vilosidades até o topo das vilosidades em questão (altura das vilosidades), e criptas intestinais (definida como o ponto de encontro entre duas vilosidades medidas até a o início da camada submucosa) para correlação com a capacidade absorptiva (razão altura das vilosidades/profundidade das criptas). A razão entre o comprimento das vilosidades intestinais e as criptas de Lieberkühn foi calculada em  $\mu\text{m}$  utilizando-se o software ImageJ versão 1.36b, sendo medidos entre 5 e 10 vilosidades e criptas por corte histológico, em microscopia óptica 100x (Microscópio Nikon com objetiva 10x e lente ocular micrométrica Leitz Wetzlar 10x).

Na avaliação histológica do cólon utilizaram-se escores proposto por Wu *et al.* (2010) e descritos a seguir: 0 = Ausência de inflamação; 1 = Baixo grau de infiltração de leucócitos; 2 = Moderado grau de infiltração de leucócitos; 3 = Elevado grau de infiltração de leucócitos; 4 = Semelhante a 3, porém com maior perda das criptas de Lieberkühn.

**Tabela 4.** Escore de Análise histopatológica para cólon

<b>ESCORE</b>	<b>ESCORES HISTOPATOLÓGICOS</b>
<b>Escore 0</b>	Ausência de inflamação
<b>Escore 1</b>	Baixo grau de infiltração de leucócitos
<b>Escore 2</b>	Moderado grau de infiltração de leucócitos
<b>Escore 3</b>	Elevado grau de infiltração de leucócitos
<b>Escore 4</b>	Semelhante a 3, porém com maior perda das criptas de Lieberkühn

Fonte: Wu *et al.* 2011.

#### **4.6.6. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

A atividade de MPO, uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é utilizada como marcador da presença de infiltrado de neutrófilos no tecido inflamado, Sua presença foi determinada por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de placas.

Uma porção do duodeno, jejuno, íleo e cólon foram coletadas e incubadas em 200 $\mu\text{L}$  de tampão gelado (NaCl 0,1 M, NaPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaEDTA 0,012 M; pH 4,7), posteriormente,



os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um triturador (Pollytron). O material homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Realizou-se, um choque hipotônico no sedimento celular (pellet) com 1000 µl de NaCl 0,2%. Após nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “*pellet*” foi ressuspensão em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 50 µL do sobrenadante do intestino foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetrametilbenzidina; 1,6 mM) e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A seguir, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. Realizou-se a quantificação dos neutrófilos a partir de uma curva padrão de neutrófilos (onde no primeiro poço havia 1 x 10<sup>5</sup> neutrófilos/ poço/ 50 µL). Determinou-se a absorbância em leitor de placas no comprimento de onda de 450 nm. Posteriormente, quantificou-se proteínas e os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de proteínas (ALVES-FILHO *et al.*, 2006).

#### 4.6.7. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada para posteriormente calcular a quantidade de neutrófilo/mg de proteína a partir da dosagem inicial de mieloperoxidase. As proteínas foram determinadas por método colorimétrico e a leitura final realizada em leitor de placas.

Após a homogeneização e centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. para dosagem de mieloperoxidase, 20 µL do sobrenadante do intestino foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 1mL do Reagente Biureto e posteriormente a placa foi incubada por 10 min a 37 °C. A seguir, determinou-se a absorbância em leitor de ELISA no comprimento de onda de 545 nm. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de proteína.

#### 4.6.8. Dosagem de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ E IL-6

Os animais tiveram as amostras intestinais retiradas no 7º dia após início da administração dos quimioterápicos para análise de citocinas e estocados em freezer -80°C até o momento do ensaio. Os tecidos coletados foram homogeneizados e processados como descrito por SAFIEH-GARABEDIAN *et al.* (1995). A detecção de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$  e

IL-6 foi determinada por ELISA, como descrito previamente (CUNHA *et al.*, 1993). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1, e anti-IL6 murino (2 $\mu$ g/mL). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal anticorpo anti-TNF-  $\alpha$ , anti-IL-1, e anti-IL6 diluídos (1:1000 com o tampão de ensaio com BSA 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 50  $\mu$ L do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. O reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 $\mu$ L) foi adicionado 15min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37 C por 15 a 20min. A reação enzimática foi parada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorbância medida a 490nm. O resultado foi expresso em pg/mL/mg proteína.

#### **4.7. Análise estatística**

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

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Padronização do modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de IRI e 5-FU

Para a padronização do modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de Irinotecano e 5-Fluorouracil, inicialmente foram realizados estudos piloto com o objetivo de se escolher a dose que induzisse lesões significativas nas mucosas intestinais com o mínimo de letalidade.

Para tal, foram investigados 4 protocolos de tratamento empregados para a seleção do modelo experimental adequado. Inicialmente foram analisadas a taxa de mortalidade, a perda de massa corpórea e a presença de diarreia dos animais.

O animal utilizado no projeto foram camundongos C57/BL. Estes animais já haviam sido utilizados em outro estudo recente do laboratório (WONG, 2013) e permitiriam também comparações futuras de resultados obtidos com a utilização de animais *knockout* da mesma espécie. A via de administração utilizada foi a intraperitoneal e a duração do tratamento foi de 4 dias com o sacrifício dos animais no sétimo dia experimental. A via e a duração já haviam sido utilizadas em outros trabalhos (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; WONG, 2013).

Os animais foram então tratados por quatro dias consecutivos com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg, i.p.), irinotecano (30 ou 45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (25, 37,5 ou 50 mg/Kg, i.p.) com um intervalo de 1h entre os quimioterápicos.

Quanto à taxa de mortalidade (Figura 9A), observou-se a taxa de mortalidade de 100% no grupo injetado com a associação de irinotecano (30 mg/Kg) + 5-FU (50 mg/Kg) versus o grupo injetado com salina (0% de mortalidade,  $p < 0,001$ ) ou o grupo que recebeu apenas irinotecano (30 mg/Kg,  $p < 0,001$ ). O grupo injetado apenas com 5-FU (50 mg/Kg) também aumentou de forma significativa a mortalidade (83,3%) dos animais quando comparado ao grupo salina ( $p < 0,01$ , Figura 9A).

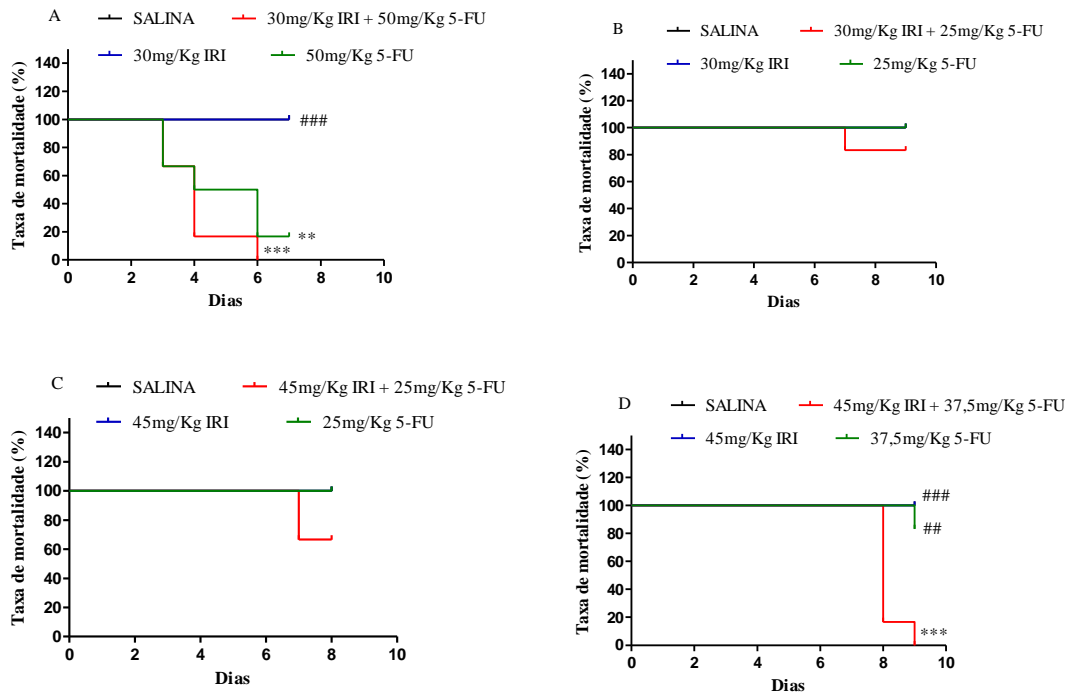
Em um segundo protocolo de associação de doses (Figura 9B), observou-se uma taxa de mortalidade de 16,7% no grupo injetado com a associação de irinotecano (30 mg/Kg) + 5-

FU (25 mg/Kg). O grupo injetado com salina ou que recebeu apenas irinotecano (30 mg/Kg) ou apenas 5-FU (25 mg/Kg) apresentaram uma taxa de mortalidade de 0% (Figura 9B).

Em um terceiro protocolo (Figura 9C), observou-se a taxa de mortalidade de 33,3% no grupo injetado com a associação de irinotecano (45mg/Kg) + 5-FU (25mg/Kg). O grupo injetado com salina ou que recebeu apenas irinotecano (45mg/Kg) ou apenas 5-FU (25mg/Kg) apresentaram uma taxa de mortalidade de 0% (Figura 9C).

No quarto protocolo de padronização de dose (Figura 9D), observou-se a taxa de mortalidade de 100% no grupo injetado com a associação de irinotecano (45mg/Kg) + 5-FU (37,5 mg/Kg) versus o grupo injetado com salina (0% de mortalidade,  $p < 0,001$ ) ou o grupo que recebeu apenas irinotecano (45 mg/Kg,  $p < 0,001$ ). O grupo injetado apenas com 5-FU (37,5 mg/Kg) também aumentou de forma significativa a mortalidade (16,7%) dos animais quando comparado ao grupo associado ( $p < 0,01$ , Figura 9D).

**Figura 9.** Taxa de mortalidade nos protocolos para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.



Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos via i.p. com solução salina 0,9% (100uL, i.p.) ou nas doses de irinotecano (30 e 45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (25, 37,5 e 50 mg/Kg, i.p.). As taxas de mortalidade foram calculadas pela curva de Kaplan-Meier e a diferença entre os grupos pelo teste de Log-rank. \*\*\* $p < 0,001$  versus o grupo salina; ### $p < 0,001$  versus o grupo associado.

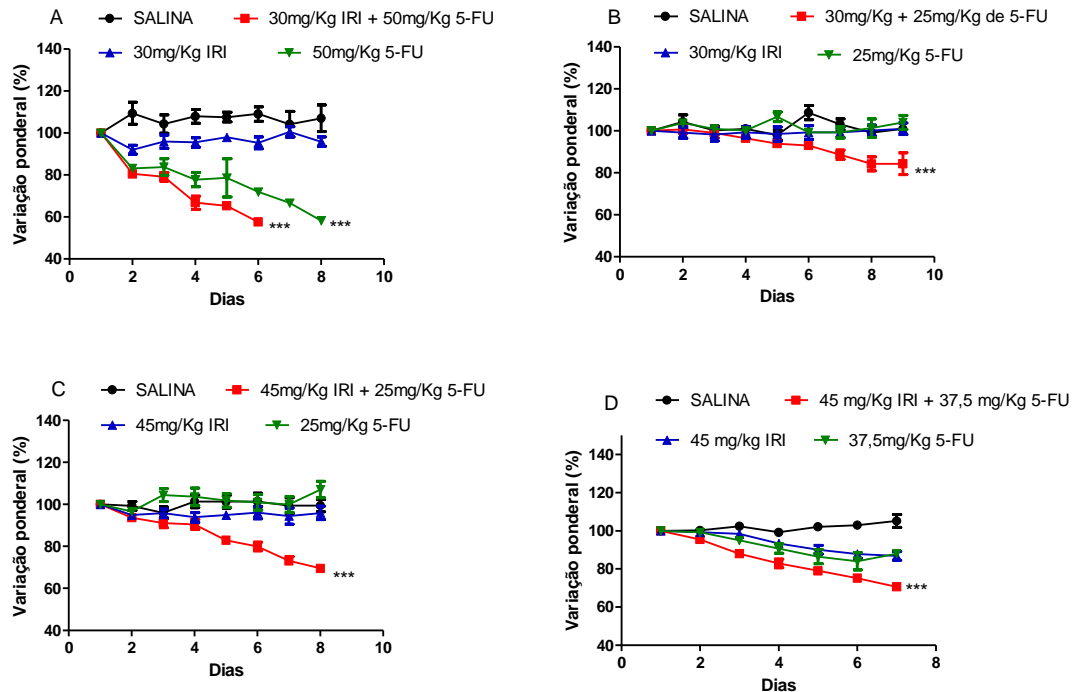
Quanto à perda ponderal (Figura 10A-D), observou-se que o grupo injetado com irinotecano (30 mg/Kg) não apresentou perda ponderal significativa ( $P > 0,05$ ) versus o grupo salina. Entretanto, os grupo injetados com a associação irinotecano (30 mg/Kg) + 5-FU (50 mg/Kg) ou com 5-FU (50 mg/Kg) isoladamente promoveram uma redução de massa corpórea em 42,31% e 41,67%, respectivamente, quando comparados ao grupo salina ( $p < 0,001$ ) (Figura 10A).

Em um segundo protocolo de associação de doses, observou-se que o grupo injetado com irinotecano (30 mg/Kg) e ou com 5-FU (25 mg/Kg) não apresentou perda ponderal significativa ( $p > 0,05$ ) versus o grupo salina. Entretanto, o grupo injetado com a associação irinotecano (30 mg/Kg) + 5-FU (25 mg/Kg) apresentou uma redução de massa corpórea em 15,7% quando comparados ao grupo salina ( $p < 0,001$ ) (Figura 10B).

Em um terceiro protocolo, observou-se que o grupo injetado com irinotecano (45 mg/Kg) e ou com 5-FU (25 mg/Kg) não apresentou perda ponderal significativa ( $p > 0,05$ ) versus o grupo salina. Entretanto, o grupo injetado com a associação irinotecano (45 mg/Kg) + 5-FU (25 mg/Kg) apresentou uma redução de massa corpórea em 30,48% quando comparados ao grupo salina ( $p < 0,001$ ) (Figura 10C).

No quarto protocolo de padronização de dose, observou-se que o grupo injetado com irinotecano (45 mg/Kg) e com 5-FU (37,5 mg/Kg) não apresentou perda ponderal significativa ( $p > 0,05$ ) versus o grupo salina, apresentando uma redução da massa corpórea em 13,19% e 11,97% respectivamente. Entretanto, o grupo injetado com a associação irinotecano (45 mg/Kg) + 5-FU (37,5 mg/Kg) apresentou uma redução de massa corpórea em 30,48% quando comparados ao grupo salina ( $p < 0,001$ ) (Figura 10D).

**Figura 10.** Variação ponderal nos protocolos de tratamento para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.



Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos via i.p. com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg) ou nas doses de irinotecano (30 e 45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (25, 37,5 e 50 mg/Kg, i.p.). A variação da massa corpórea foi avaliada diariamente. Os pontos representam média  $\pm$  EPM da variação percentual de massa corpórea, calculada através das diferenças das massas corpóreas obtidas diariamente e a massa inicial. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA/Bonferroni \*\*\* $p < 0,001$  versus o grupo salina.

Quanto à análise dos escores de diarreia (Tabelas 4, 5, 6, 7) observou-se (Tabela 4) que os grupos injetados com irinotecano (30 mg/Kg), 5-FU (50 mg/Kg) ou com a associação irinotecano (30 mg/Kg) + 5-FU (50 mg/Kg) não apresentaram diarreia significativa versus o grupo salina ( $P > 0,05$ ).

Em um segundo protocolo de associação de doses, observou-se (Tabela 5) que os grupos injetados com irinotecano (30 mg/Kg), 5-FU (25 mg/Kg) ou com a associação Irinotecano (30 mg/Kg) + 5-FU (25 mg/Kg) não apresentaram diarreia significativa versus o grupo salina ( $p > 0,05$ ), sendo os valores de escores de diarreia obtidos para cada grupo no sétimo dia experimental: Salina [1(0-1)]; irinotecano [0,5(0-1)]; 5-FU [0(0-2)] e Irinotecano + 5-FU [0(0-1)].

Em um terceiro protocolo, observou-se (Tabela 6) que os grupos injetados com irinotecano (45 mg/Kg), 5-FU (25 mg/Kg) ou com a associação Irinotecano (45 mg/Kg) + 5-FU (25 mg/Kg) não apresentaram diarreia significativa versus o grupo salina ( $p > 0,05$ ), sendo os valores de escores de diarreia obtidos para cada grupo no sétimo dia experimental: Salina [0,5(0-1)]; irinotecano [0,5(0-1)]; 5-FU [0(0-1)] e Irinotecano + 5-FU [0(0-1)].

No quarto protocolo de padronização de dose, observou-se (Tabela 7) que os grupos injetados com irinotecano (45 mg/Kg) + 5-FU (37,5 mg/Kg) apresentaram diarreia significativa versus o grupo salina ( $p < 0,05$ ). Ao contrario, os escores de diarreia dos grupos tratados com irinotecano (45mg/Kg) e 5-FU (37,5 mg/Kg) isoladamente foram diferentes estatisticamente do grupo associado, sendo os valores de escores de diarreia obtidos para cada grupo no sétimo dia experimental: Salina [0(0-1)]; irinotecano [0,5(0-1)]; 5-FU [0(0-1)] e Irinotecano + 5-FU [2(0-3)].



**Tabela 5.** Avaliação dos escores de diarreia no primeiro protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.

Tempo (Dias)	Protocolos de indução			
	SALINA	IRI (30 mg/kg)+	IRI	5-FU
		5-FU (50 mg/kg)	(30 mg/kg)	(50 mg/kg)
1	0,5(0-1)	0(0-2)	0(0-1)	0(0-0)
2	1(0-1)	1(0-2)	0(0-1)	0(0-2)
3	0(0-1)	0,5(0-2)	0(0-1)	1(0-2)
4	1(0-1)	2(0-3)*	0(0-1)	0(0-2)
5	1(0-1)	1(0-2)	1(0-1)	0(0-0)
6	1(0-1)	-	0(0-1)	0(0-0)
7	0(0-1)	-	0(0-1)	0(0-0)

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum tempo analisado (n=6/grupo).

**Tabela 6.** Avaliação dos escores de diarreia no segundo protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.

Tempo (Dias)	Protocolos de indução			
	SALINA	IRI (30 mg/kg)+	IRI	5-FU
		5-FU (25 mg/kg)	(30 mg/kg)	(25 mg/kg)
1	0,5(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
2	1(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
3	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
4	1(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-0)
5	0(0-0)	0(0-1)	0,5(0-1)	0(0-1)
6	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-2)
7	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum tempo analisado (n=6/grupo).

**Tabela 7.** Avaliação dos escores de diarreia no terceiro protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.

Tempo (Dias)	Protocolos de indução			
	SALINA	IRI (45 mg/kg)+	IRI	5-FU
		5-FU (25 mg/kg)	(45 mg/kg)	(25 mg/kg)
1	0,5(0-1)	0(0-1)	0,5(0-1)	0(0-1)
2	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
3	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
4	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-0)
5	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
6	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
7	0(0-1)	0(0-1)	0(0-0)	0(0-1)

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum tempo analisado (n=6/grupo).

**Tabela 8.** Avaliação dos escores de diarreia no quarto protocolo para indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.

Tempo (Dias)	Protocolos de indução			
	SALINA	IRI (45 mg/kg)+	IRI	5-FU
		5-FU (37,5 mg/kg)	(45 mg/kg)	(37,5 mg/kg)
1	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0,5(0-1)
2	0(0-1)	0,5(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
3	0(0-1)	0(0-2)	0(0-1)	0(0-1)
4	0(0-1)	0(0-2)	0(0-1)	0(0-1)
5	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)
6	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0(0-2)
7	0(0-1)	2(0-3)*	0,5(0-1) <sup>#</sup>	0(0-1) <sup>##</sup>

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). \*p < 0,05 vs grupo salina; <sup>#</sup>p < 0,05 vs grupo associado (n=6/grupo).

No processo de padronização do modelo de mucosite intestinal induzida pela associação de irinotecano e 5-Fluorouracil observou-se que as doses ideais foram as doses de irinotecano (45 mg/Kg) e de 5-FU (37,5 mg/Kg). Essas doses foram as que induziram significativa perda de massa corpórea e diarreia no sétimo dia, com elevada taxa de mortalidade a partir do oitavo dia como mostrado no quarto protocolo de padronização (Tabela 8). Por isso, definiu-se o sétimo dia como o ideal para o sacrifício dos animais para coleta de amostras de sangue e intestino e realização de ensaios biológicos. Foram utilizados grupos controle salina irinotecano e 5-FU isoladamente.

**Tabela 9.** Resumo dos parâmetros analisados durante a padronização do protocolo de indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.

DOSES (mg/kg)		PARÂMETROS		
Irinotecano	5-FU	Taxa de mortalidade	Perda de MC	Diarreia
30	50	-	+	+
30	25	+	+	-
45	25	+	+	-
45	37,5	+	+	+

A tabela acima mostra que a associação de irinotecano e de 5-FU respectivamente nas doses de 45 mg/Kg e 37,5 mg/Kg foi o protocolo mais promissor, pois permitiu que todos os parâmetros fossem afetados possibilitando a padronização do modelo de indução de mucosite intestinal.

## **5.2. Modelo padronizado de mucosite intestinal induzida pela associação de IRI e 5-FU: Ensaios biológicos**

Após a padronização do modelo e escolha do protocolo ideal, irinotecano (45mg/Kg, i.p) + 5-Fluorouracil (37,5mg/Kg, i.p) foram administrados durante quatro dias consecutivos e um novo experimento foi realizado para observância dos parâmetros de toxicidade relacionados à mucosite intestinal, incluindo-se: lesão histopatológica, morfometria intestinal, atividade de mieloperoxidase, dosagem tecidual de citocinas, imunohistoquímica e leucograma.

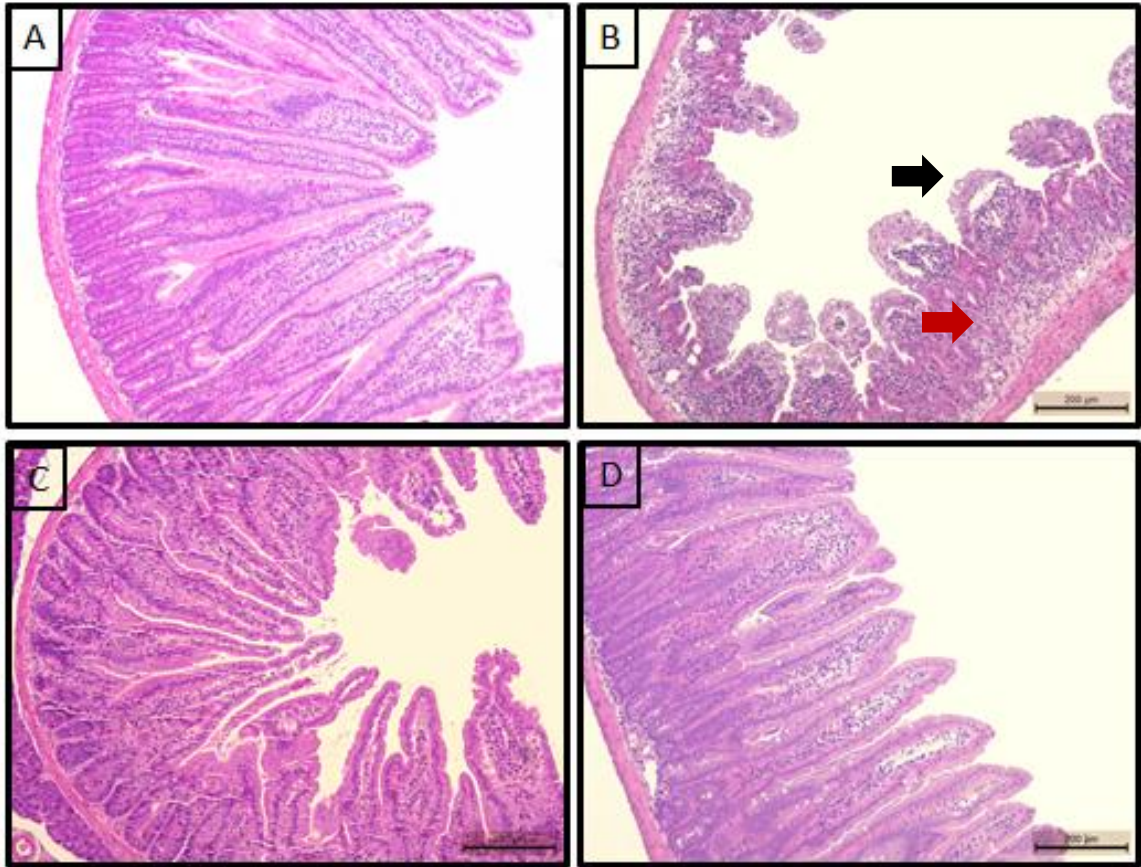
### 5.2.1. Análise histopatológica e morfometria

As figuras 11-14 mostram as alterações histopatológicas observadas no duodeno (Figura 11), jejuno (Figura 12), íleo (Figura 13) e cólon (Figura 14) dos animais tratados com a associação irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 i.p.) administrada por quatro dias consecutivos. Os animais nos quais foram administrados salina (Figura 11A, 12A, 13A e 14A), irinotecano (45 mg/Kg, i.p., Figura 11C, 12C, 13C e 14C) ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p., Figura 11D, 12D, 13D e 14D) apresentaram as estruturas intestinais do duodeno, jejuno, íleo e colon normais com vilosidades e criptas íntegras, com epitélio cilíndrico recobrendo os vilos intestinais e a estrutura intacta das criptas com células de Paneth. Entretanto, nos animais submetidos ao tratamento durante quatro dias com a associação irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 i.p.), observou-se encurtamento acentuado das vilosidades intestinais, necrose parcial de criptas, achatamento e vacuolização de enterócitos, presença de infiltrado celular inflamatório na mucosa com predomínio de células polimorfonucleares (Figura 11B, 12B, 13B e 14C).

A Figura 15 mostra os dados morfométricos dos vilos e criptas do duodeno, jejuno e íleo. Os resultados mostram que a associação de irinotecano (45mg/Kg) + 5-FU (37,5 mg/Kg) provocou encurtamento significativo nos vilos intestinais, principalmente do jejuno e do íleo ( $p < 0,001$ ) de forma similar à observada com os fármacos administrados isoladamente quando comparados ao grupo salina. Em relação à profundidade das criptas, a associação não foi capaz de induzir modificações relevantes nos segmentos avaliados ( $p > 0,05$  vs salina). Adicionalmente, a razão vilo/cripta foi significativamente alterada em todos os protocolos quimioterápicos empregados, especialmente no jejuno, quando comparado com o grupo salina ( $p < 0,05$ ).

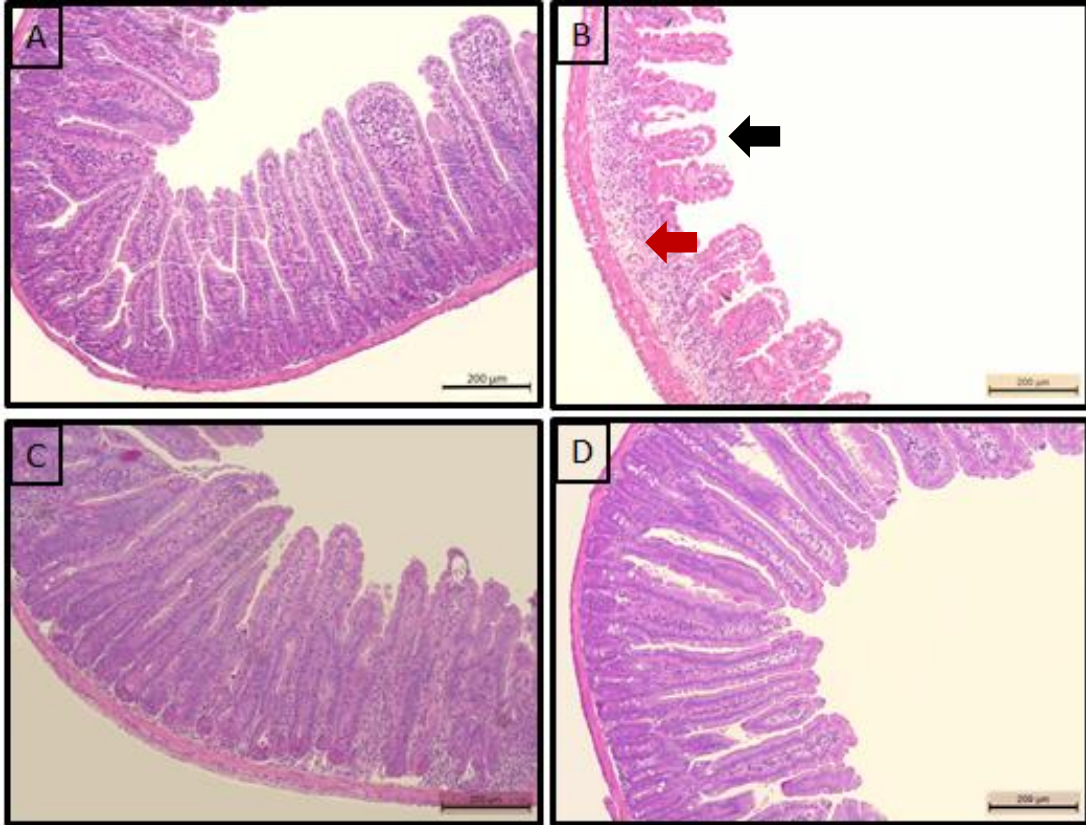
Quanto à análise semi-quantitativa cega das lesões intestinais, observou-se (Tabela 9) que o grupo injetado com irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) apresentou elevação significativa do dano histopatológico versus o grupo salina ( $p < 0,01$ ). Ao contrário, os escores de lesão dos grupos tratados com irinotecano (45mg/Kg) ou 5-FU (37,5 mg/Kg) administrados isoladamente foram diferentes estatisticamente do grupo associado ( $p < 0,001$ ).

**Figura 11.** Fotomicrografia da mucosa do duodeno após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU



Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos via i.p. com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg) ou nas doses de irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental e o duodeno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (A-D – aumento de 100x). A mucosa intestinal de animais saudáveis administrados salina, irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) ou 5-FU (37,5 mg/Kg i.p.), mostra vilos e criptas preservados (Painel A, C e D). A mucosa intestinal de animais que receberam irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 mg/Kg i.p.) (Painel B), mostra encurtamento dos vilos (setas pretas), achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas e infiltrado de células polimorfonucleares (setas vermelhas).

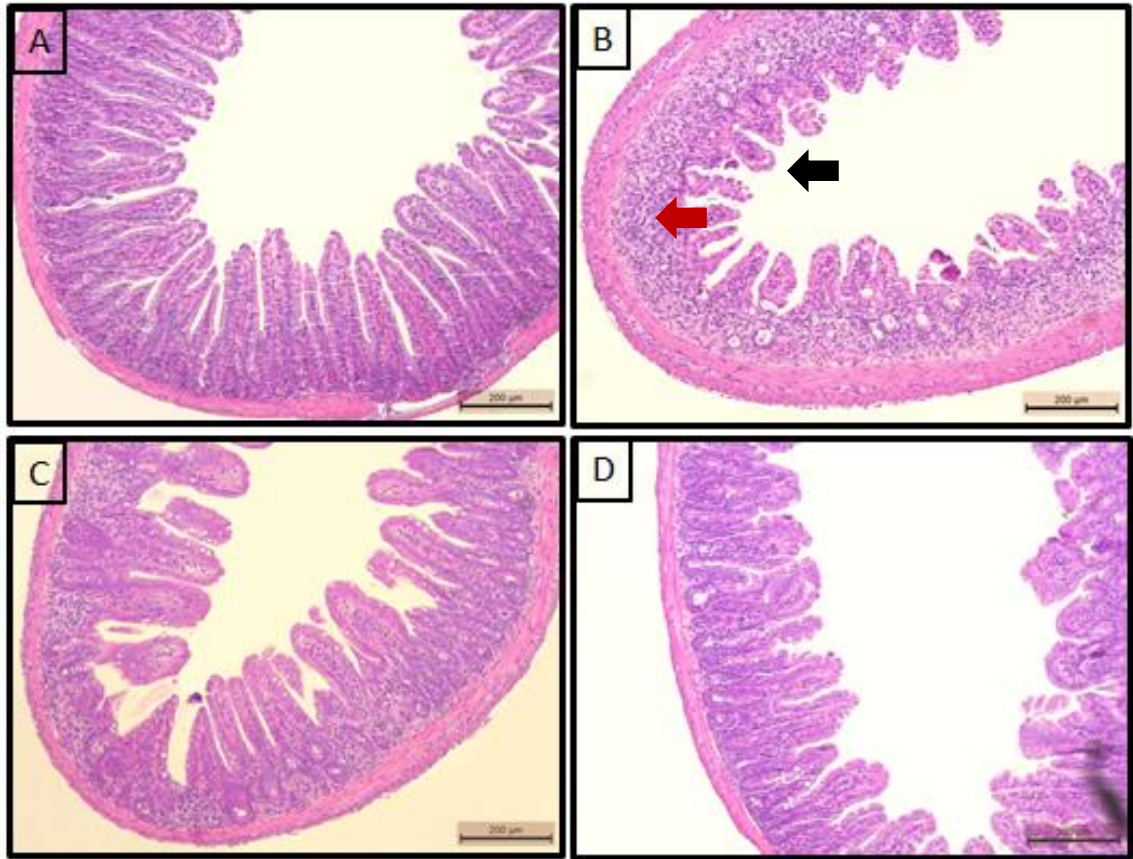
**Figura 12.** Fotomicrografia da mucosa do jejuno após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.



Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos via i.p. com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg) ou nas doses de irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental e o jejuno foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (A-D – aumento de 100x). A mucosa intestinal de animais saudáveis administrados salina, irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) ou 5-FU (37,5 mg/Kg i.p.), mostra vilos e criptas preservados (Painel A, C e D). A mucosa intestinal de animais que receberam irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 mg/Kg i.p.) (Painel B), mostra encurtamento dos vilos (setas pretas), achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas e infiltrado de células polimorfonucleares (setas vermelhas).

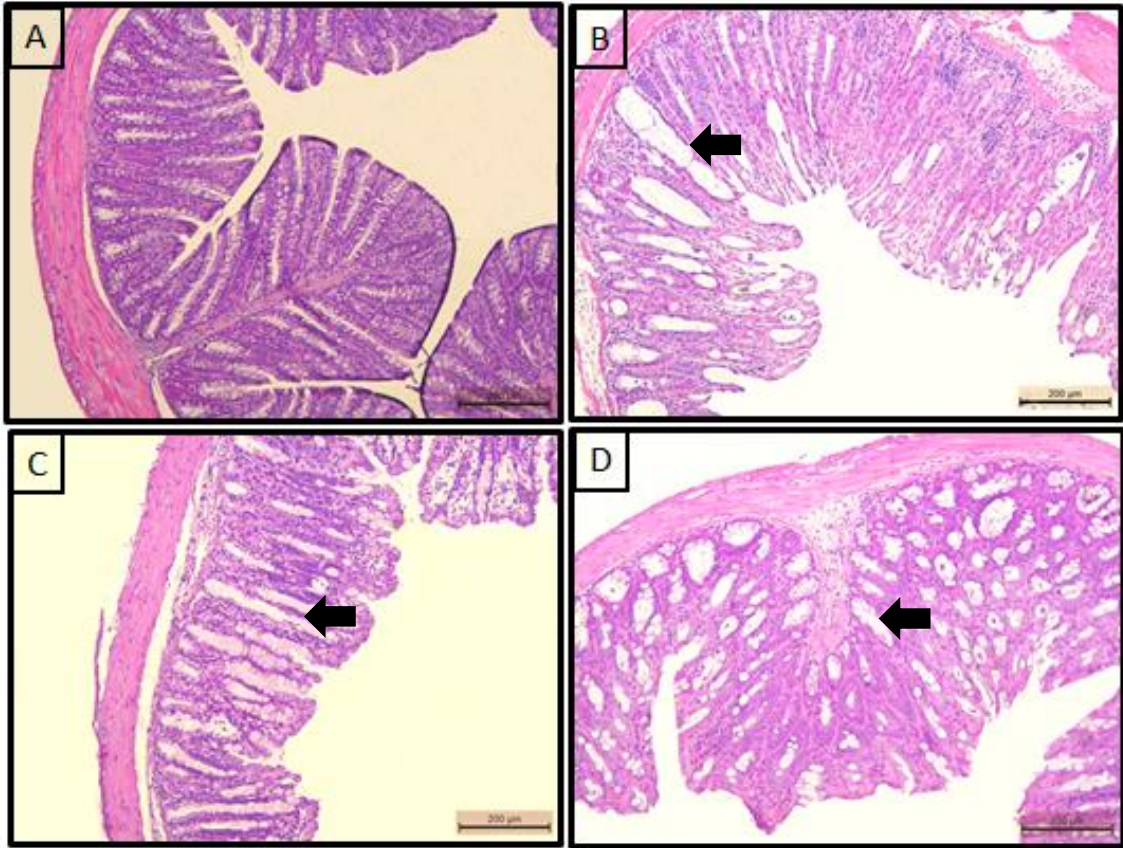


**Figura 13.** Fotomicrografia da mucosa do ileo após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.



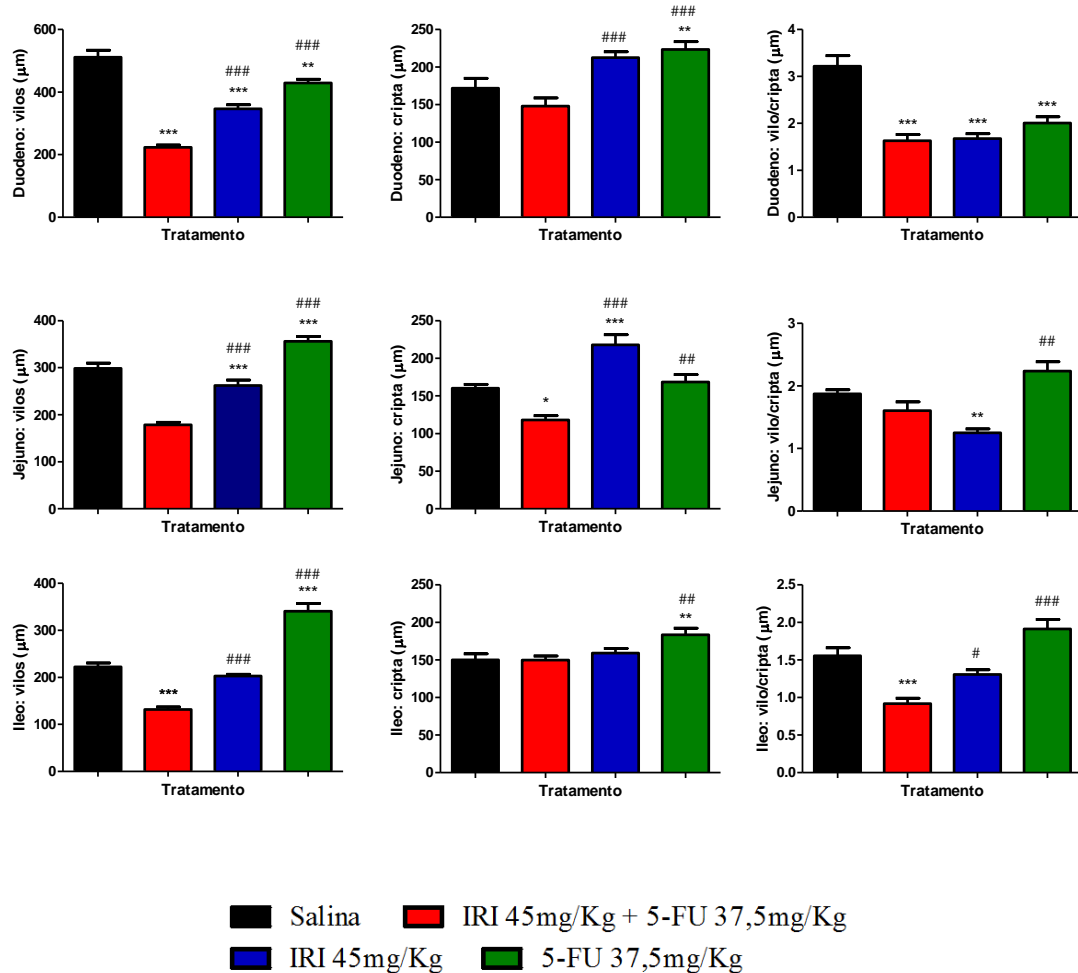
Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos via i.p. com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg) ou nas doses de irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental e o ileo foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (A-D – aumento de 100x). A mucosa intestinal de animais normais em que foram administrada salina, irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) ou 5-FU (37,5 i.p.), mostra vilos e criptas preservados (Painel A, C e D). A mucosa intestinal de animais que receberam irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 i.p.) (Painel B), mostra encurtamento dos vilos (setas pretas), achatamento e vacuolização de enterócitos, necrose de criptas e infiltrado de células polimorfonucleares (setas vermelhas).

**Figura 14.** Fotomicrografia da mucosa do colon após indução de mucosite intestinal pela associação de IRI e 5-FU.



Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos via i.p. com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg) ou nas doses de irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.). Foram sacrificados no sétimo dia experimental e o colon foi removido e processado para a técnica de coloração pelo método H&E (A-D – aumento de 100x). A mucosa intestinal de animais normais em que foram administrada salina, irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e/ou 5-FU (37,5 i.p.), mostra vilos e criptas com vacuolização (setas pretas) (Painel B, C e D).

**Figura 15.** Efeito do protocolo associado de indução de mucosite intestinal sobre a morfometria intestinal de camundongos C57BL/6.



Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos com solução salina 0,9% (100uL) (Barra preta), com irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) (Barra vermelha), irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) (Barra azul) ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) (Barra verde). Foram sacrificados no sétimo dia experimental, e segmentos do duodeno, jejuno e íleo foram removidos e processados para a técnica de coloração pelo método H&E. Os valores representam média  $\pm$  EPM e foram analisados pelo teste ANOVA/Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  versus o grupo salina; ### $p < 0,001$  versus o grupo associado.

**Tabela 10.** Efeito da associação de IRI e 5-FU nos escores histopatológicos de indução de mucosite intestinal.

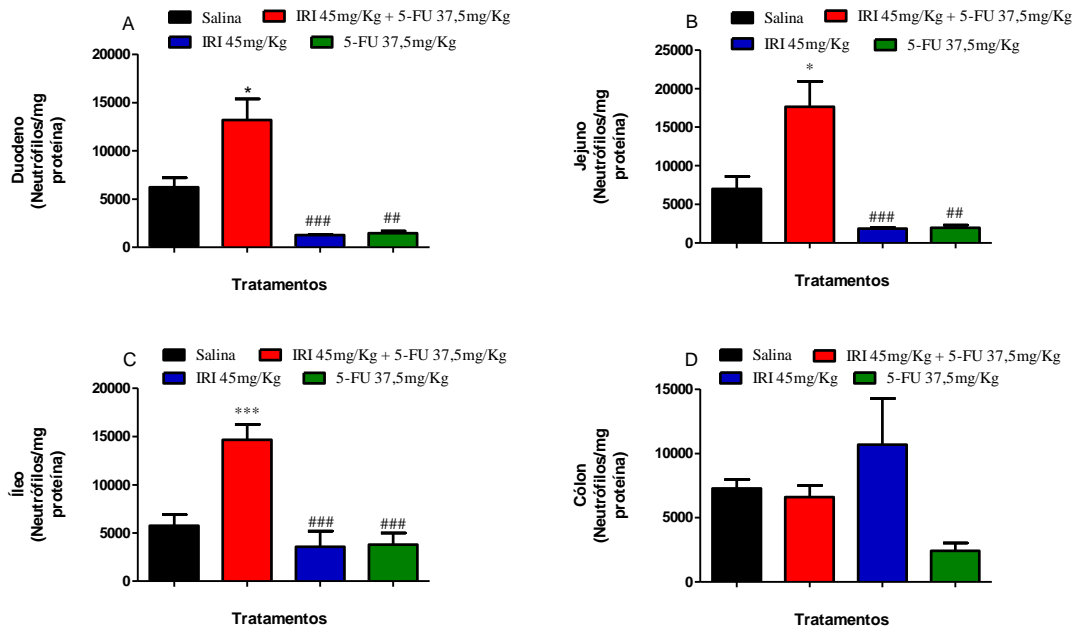
Porções intestinais	Protocolos de indução			
	SALINA	IRI (45 mg/kg)+	IRI	5-FU
		5-FU (37,5 mg/kg)	(45 mg/kg)	(37,5 mg/kg)
DUODENO	0(0-0)	4(4-4)**	0(0-1)	1(1-1)
JEJUNO	0(0-0)	4(4-4)**	3(2-4)*	1,5(0-3)
ILEO	0(0-2)	4(4-4)**	2(2-3)	0,5(0-1)#
COLON	0(0-0)	4(4-4)**	3(1-4)*	1(0-3)

Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn. Os valores foram expressos como mediana (mínimo-máximo). \*p < 0,05 vs grupo salina; #p < 0,05 vs grupo associado (n=6/grupo).

### **5.2.2. Dosagem de mieloperoxidase**

A figura 16 mostra que o tratamento com a associação de irinotecano (45mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade de MPO nas porções intestinais de duodeno, jejuno e íleo quando comparados ao grupo salina. Entretanto, no cólon não se verificou qualquer alteração no padrão inflamatório entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Figura 16.** Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em diferentes segmentos intestinais de camundongos C57BL/6.

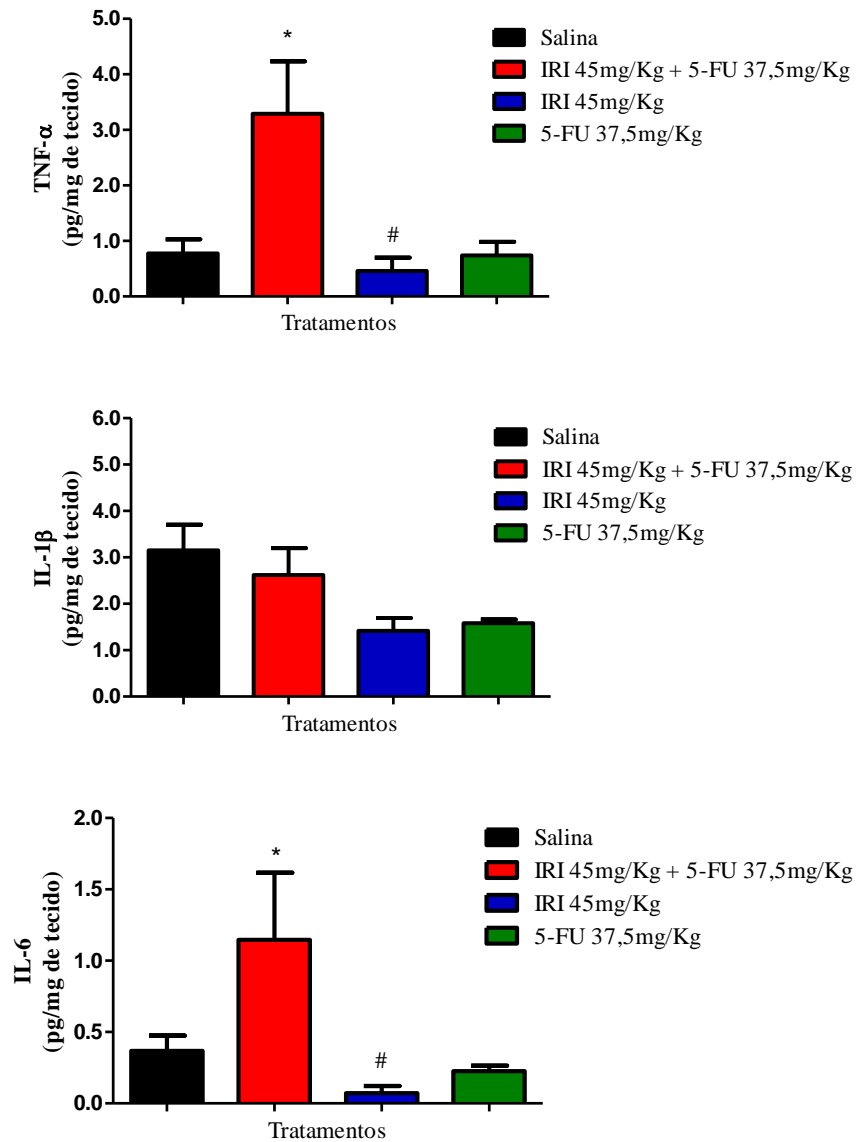


Os animais ( $n = 6/\text{grupo}$ ) foram tratados por quatro dias consecutivos com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg), com irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.), irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) e sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos de duodeno (painel A), jejuo (painel B), íleo (painel C) e cólon (painel D) foram removidos e congelados para posterior dosagem da atividade de Mieloperoxidase (MPO). Os valores representam média  $\pm$  EPM de neutrófilos/mg de proteína e foram analisados pelo teste ANOVA/Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  versus o grupo salina; ### $p < 0,001$  versus o grupo associado.

### 5.2.3. Dosagem de citocinas

A figura 9 mostra o efeito do tratamento com a associação de irinotecano (45mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) sobre os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 no ileo de animais sacrificados no 7º dia. A associação aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis intestinais de TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparados ao grupo salina. Entretanto, não se verificou diferença estatística entre os grupos injetados com os quimioterápicos e os níveis teciduais de IL-1( $p > 0,05$ ).

**Figura 17.** Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre nos níveis de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) no íleo de camundongos C57BL/6.



Os animais ( $n = 6$ /grupo) foram tratados por quatro dias consecutivos com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg), irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.), irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) e sacrificados no sétimo dia experimental. Segmentos do íleo foram removidos e congelados para posterior dosagem de citocinas. O ensaio foi realizado por ELISA. Os valores representam média  $\pm$  EPM de pg/mg de tecido e foram analisados pelo teste ANOVA/Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  versus o grupo salina; ### $p < 0,001$  versus o grupo associado.

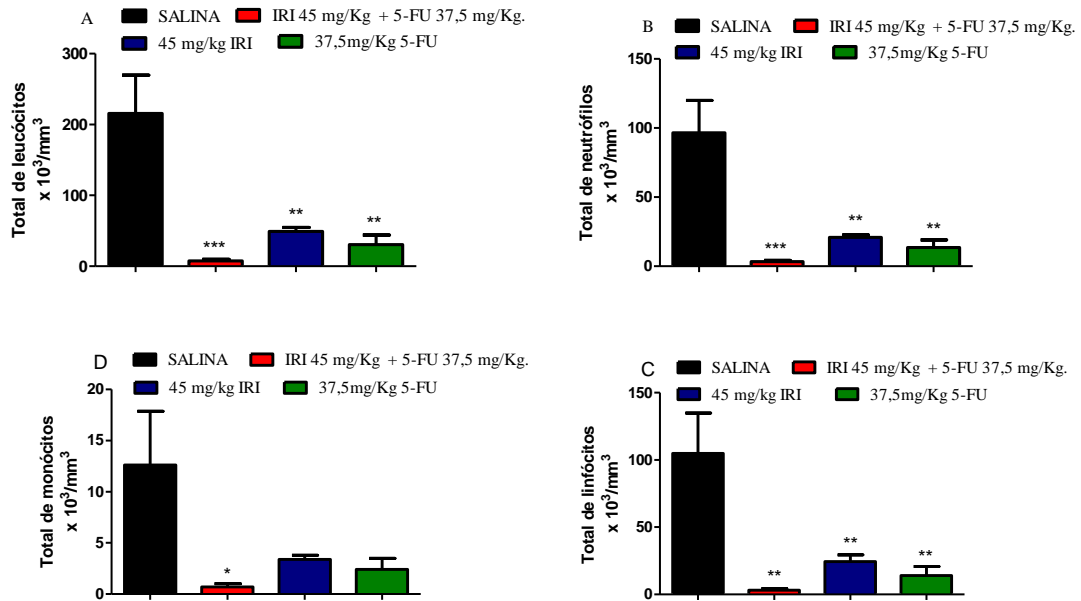


#### **5.2.4. Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre o leucograma**

A figura 18 mostra o efeito do tratamento por 4 dias consecutivos com a associação de irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.), irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) sobre a contagem total de leucócitos em de animais sacrificados no 7º dia. As injeções reduziram significativamente o número de leucócitos ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$  respectivamente) causando leucopenia acentuada principalmente no grupo injetado com a associação de quimioterápicos .

A figura 18 mostra o efeito do tratamento por 4 dias consecutivos com a associação de irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.), irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) e 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) sobre a contagem diferencial de leucócitos. Observou-se que houve diferença estatística entre os entre os grupos quanto à contagem de neutrófilos, monócitos e linfócitos.

**Figura 18.** Efeito da associação de IRI e 5-FU sobre a contagem total e diferencial de leucócito em camundongos C57BL/6.



Os animais (n = 6/grupo) foram tratados por quatro dias consecutivos com solução salina 0,9% (0,5 mL/Kg, i.p.), com irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) + 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.), irinotecano (45 mg/Kg, i.p.) ou 5-FU (37,5 mg/Kg, i.p.) e foram sacrificados no sétimo dia experimental. O sangue foi colhido por punção na artéria ocular imediatamente antes do sacrifício e a contagem do número total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e confeccionada lâminas pra contagem diferencial. Os valores representam média  $\pm$  EPM do número total de leucócitos x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> e foram analisados pelo teste ANOVA/Bonferroni. \*\*\*p < 0,001 versus o grupo salina.

## 6. DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que a associação dos quimioterápicos irinotecano e 5-Fluorouracil (5-FU), respectivamente nas doses de 45 mg/Kg e 37,5 mg/Kg, causou uma significativa lesão na mucosa intestinal, com evidente perda do epitélio, observando-se alterações de arquitetura epitelial com encurtamento das vilosidades e vacuolização e necrose celular das criptas intestinas. Adicionalmente, verificou-se um aumento da resposta inflamatória, visualizada pela presença de infiltrado celular polimorfonuclear, e diarreia nos animais. Dados obtidos em outros estudos de nosso laboratório, que também estudaram o modelo utilizando os quimioterápicos administrados isoladamente evidenciaram resultados similares, tanto para o irinotecano (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; WONG, 2013) como para o 5-Fluorouracil (Soares, 2008). É lícito salientar que naqueles estudos utilizaram-se doses superiores às de nosso estudo. Isso se justifica, pois a associação de doses muito elevadas mataria todos os animais antes do sétimo dia, que é considerado o dia ideal para o sacrifício em estudos anteriores.

Em *guideline* publicado em 2007, Keefe e colaboradores referem que a incidência, gravidade e localização da mucosite, se oral ou intestinal, estão intimamente relacionadas ao tipo de protocolo quimioterápico anticâncer, ou seja, é dependente dos fármacos utilizados, bem como da dose e da duração do tratamento. Desta forma, nosso estudo torna-se ainda mais relevante, pois visou à padronização das doses e duração de administração para a indução de mucosite intestinal.

O protocolo de tratamento utilizado em nosso estudo foi baseado no modelo de mucosite intestinal utilizado por IKUNO *et al.* (1995), no qual o irinotecano era administrado em camundongos na dose de 100 mg/kg por quatro dias consecutivos. No entanto, sabe-se que existem protocolos experimentais utilizando irinotecano no qual este quimioterápico é administrado uma única injeção endovenosa na dose de 200 mg/kg em ratos produzindo com essa dose mucosite intestinal determinada pelos níveis de diarreia e histologia e apresentando baixa mortalidade (GIBSON *et al.*, 2007; LOGAN *et al.*, 2008). Adicionalmente, Soares (2008), Soares *et al.* (2008, 2011, 2013) demonstraram que o 5-FU injetado na dose de 450 mg/kg em dose única foi capaz de induzir lesão intestinal cursando com inflamação e dismotilidade.

Em adição, a escolha das doses utilizadas em nosso trabalho baseou-se em estudos prévios do nosso laboratório (Melo 2007; MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012; Soares, 2008; Soares *et al.*, 2008, 2011, 2013). MELO *et al.* (2008), em camundongos Swiss, demonstraram que o irinotecano é capaz de induzir lesão intestinal a partir das doses de 50-75 mg/kg, sendo doses menores pouco eficazes quanto à geração do dano intestinal. Esse fato foi corroborado por LIMA-JÚNIOR (2008) em camundongos C57BL/6 e Balb/C nos quais as doses mais adequadas para indução de mucosite intestinal por irinotecano é a dose de 60 mg/Kg, pois esta foi a dose que induziu alterações histopatológicas e morfométricas, aumento da contratilidade intestinal e diarreia, infiltrado inflamatório e leucopenia.

Levando-se em consideração ao que foi supracitado e sabendo que os quimioterápicos, como o irinotecano, raramente são utilizados em protocolos anticâncer isoladamente, optamos por elaborar um modelo que reproduzisse de forma mais fidedigna a prática clínica. Exemplo disso são os regimes quimioterápicos antineoplásicos para tratamento de câncer colorretal, no qual o irinotecano é administrado juntamente com a oxaliplatina (Protocolo IROX) ou com o 5-fluorouracil (Protocolos FOLFIRI [5-FU administrado em infusão contínua] ou IFL [5-FU injetado por via e.v. em bolus]) (GUIMARÃES, 2008). Como na prática clínica geralmente utilizam-se protocolos antineoplásicos administrados em ciclos, e não em dose única, em nosso trabalho optou-se por seguir o protocolo de injeções repetidas do irinotecano e incorporar a este as doses de 5-FU em camundongos C57BL/6.

A padronização foi realizada através da associação de várias doses de irinotecano e 5-fluorouracil. O primeiro protocolo utilizou a associação de irinotecano (30 mg/Kg) + 5-FU (50 mg/Kg); o segundo, a associação de irinotecano (30 mg/Kg) + 5-FU (25 mg/Kg); o terceiro, a associação de irinotecano (45 mg/Kg) + 5-FU (25 mg/Kg) e o último a associação de irinotecano (45 mg/Kg) + 5-FU (37,5 mg/Kg). De maneira geral, buscou-se a utilização de sub-doses dos quimioterápicos. O objetivo era encontrar doses que quando administradas de forma isolada não induzissem a mucosite intestinal e que quando dadas de forma conjunta causassem alterações em parâmetros de diarreia e variação ponderal sem, no entanto, causar mortalidade significativa. Como esses achados foram mais bem observados no sétimo dia experimental, esse dia foi escolhido como o dia ideal para o sacrifício dos animais. Isso não foi corroborado por LIMA-JÚNIOR (2012) que diferentemente de nosso estudo observou que o

dia mais adequado para o sacrifício dos animais seria o quinto dia experimental, pois a partir desse dia a mortalidade aumentava significativamente.

A diarreia é um parâmetro importante quando se estuda a mucosite intestinal, sendo observada na forma precoce e na tardia quando se administra irinotecano tanto em roedores (KURITA *et al.*, 2000; TRIFAN *et al.*, 2012) quanto em humanos (GANDIA *et al.*, 1993, BLEIBERG *et al.*, 1996; SALTZ *et al.*, 2000). Nossos achados mostram que os animais nos quais foi administrada a associação de IRI (45 mg/kg) + 5-FU (37,5 mg/kg) apresentaram diarreia intensa e significativa no sétimo dia de indução da mucosite intestinal, não sendo este parâmetro observado nas injeções dos fármacos isoladamente. Corroborando esse achado, SALTZ e colaboradores (2000) claramente indicaram que a combinação de irinotecano, leucovorin e 5-FU induziu uma significativa diarreia, mas não a administração isolada de 5-FU. Entretanto, a alta dose de irinotecano utilizado pelo protocolo descrito por SALTZ foi suficiente para o desenvolvimento de diarreia nos pacientes (SALTZ *et al.*, 2000).

Wong (2013) mostrou que o irinotecano induziu significativa diarreia de grau moderado no quinto dia e grave no sétimo dia experimental quando comparado ao grupo salina, corroborando com nossos dados. Essa manifestação está ainda de acordo com os achados de LIMA-JUNIOR (2008), que, ao utilizar também camundongos C57BL/6 e duas doses distintas, 60 e 75 mg/kg, evidenciou uma lesão intestinal precoce acompanhada de diarreia já a partir do quinto dia. MELO, 2007 mostra em seu trabalho que a utilização de irinotecano na dose de 75 mg/Kg induziu diarreia tardia grave no sétimo dia em 83,33% dos animais quando comparado ao grupo controle salina.

Outro sintoma importante relatado pelos pacientes que fazem uso de irinotecano e que apresentam diarreia é a cólica abdominal. No entanto, em nosso estudo não foi realizado ensaio específico para avaliar esse parâmetro. LIMA-JÚNIOR *et al.* (2012) mostraram que o duodeno de camundongos tratados com irinotecano quando avaliados *in vitro* apresentam hipercontratilidade frente ao estímulo com acetilcolina, fazendo supor que possa ser esta a causa da cólica abdominal apresentada na prática clínica. Corroborando com esses achados, Belarmino-Filho (2010) evidenciou que a resposta inflamatória associada à mucosite por irinotecano desencadeia alterações da motilidade digestória como retardo do esvaziamento gástrico e aceleração do trânsito intestinal, que podem também estar associados à fisiopatologia da gênese dos sintomas dispépticos, da diarreia e da cólica que normalmente

podem acompanhar o curso da mucosite por irinotecano. Adicionalmente, SOARES e colaboradores (2008) mostraram que ratos injetados com 5-FU (150 mg/kg) apresentaram aumento considerável da contratilidade do fundo gástrico e do músculo do duodeno após o 3º e 15º dia após a injeção do quimioterápico. O excesso da contratilidade deste último podendo contribuir para a retenção alimentar no estômago (SOARES *et al.*, 2008). Ainda, sabe-se que o 5-FU induz uma inflamação intestinal significativa (SOARES *et al.*, 2008, 2011, 2013).

A diarreia pode ser classificada em 4 tipos de acordo com os mecanismos subjacentes: diarreia osmótica, secretória, exsudativa ou por distúrbio de motilidade. No entanto, muitas vezes a diarreia é uma combinação desses mecanismos (Revisto por RICHARDSON & DOBISH, 2007). Uma correlação relevante entre a resposta inflamatória e alterações de contratilidade intestinal foi demonstrada por DEMEDTS e colaboradores (2006). Esse estudo demonstrou que a inflamação induz alterações agudas e de longa duração na contratilidade de músculo liso intestinal, envolvendo mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico. A hipercontratilidade apresentada pelos animais após a administração de quimioterápicos (SOARES *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012) pode servir de base, em parte, para explicar o motivo pela qual os animais que apresentam mucosite intestinal exibem quadros de diarreia significativa (RIEZZO *et al.* 2005) em nosso modelo.

Muito se tem estudado sobre o principal sintoma da mucosite intestinal induzida por irinotecano, a diarreia. No entanto, os mecanismos envolvidos ainda são pouco compreendidos. CARNEIRO-FILHO e colaboradores (2004) demonstraram que o metotrexato, outro quimioterápico antineoplásico, induz dano de barreira, evidenciado pela diminuição da excreção urinária de manitol, devido à redução da área de absorção pela mucosa intestinal, e aumento significativo da secreção intestinal de sódio e potássio. Em um estudo clínico realizado por nosso laboratório e que utilizou um protocolo mais à semelhança do estudado em nossa pesquisa (irinotecano associado ao 5-FU), utilizou-se uma amostragem de 20 pacientes portadores de câncer colorretal metastático tratados no Hospital Haroldo Juaçaba do Instituto do Câncer do Ceará, com o regime quimioterápico IFL (Irinotecano, 5-FU e Leucovorin) e avaliados antes e após cada ciclo de quimioterapia (GIFONI, 2012). Evidenciou-se uma clara e significativa diminuição da excreção urinária de manitol, sem, contudo, observar-se alteração da excreção de lactulose. Observou-se ainda nesses pacientes uma redução da razão lactulose/manitol (GIFONI, 2012). Dessa forma, WONG (2013) avaliou o funcionamento da barreira intestinal por meio do teste de permeabilidade intestinal

aos açúcares lactulose e manitol, mostrando que o irinotecano diminui a excreção urinária de lactulose no sétimo dia experimental, quando comparado ao grupo salina. No entanto, não foi capaz de alterar a excreção urinária de manitol alterando (diminuindo) a razão Lactulose/Manitol no quinto dia experimental.

WONG (2013), a exemplo dos resultados evidenciados para o metotrexato com relação à secreção intestinal, demonstrou que o irinotecano induz um aumento da secreção de sódio, potássio e cloreto, os quais foram mensurados no teste de perfusão intestinal. De modo complementar, STRINGER e colaboradores (2009) evidenciaram que o irinotecano induz uma diminuição sérica de sódio em ratos, corroborando com o aumento da secreção intestinal deste íon. WONG cita ainda que estudos de funcionamento da barreira podem ser importantes para o estudo do padrão de alteração de barreira secundária aos quimioterápicos, podendo ser diferente para cada quimioterápico utilizado (WONG, 2013), isoladamente ou em associação como ocorre no nosso estudo sendo uma possibilidade futura para este novo modelo padronizado.

Um fator que se acredita ser responsável pela mucosite e diarreia decorrentes do tratamento quimioterápico à base de irinotecano é a acumulação intestinal dos metabólitos do irinotecano, em especial o SN-38 (GUPTA *et al.*, 1994). Em humanos, o irinotecano é hidrolisado por carboxilesterases, presentes na mucosa intestinal, plasma sanguíneo e fígado, gerando um metabólito com capacidade citotóxica mil vezes maior que a molécula parental, o composto SN-38 (7-etil-10-hidroxicamptotecina). Este produto metabólico é conjugado a um grupamento glicuronídeo pela enzima UGT1A1 (uridina difosfato glicuronosil transferase) tornando-se inativo (de JONGE *et al.*, 1998; LYER *et al.*, 1998) e sendo eliminado primariamente por via biliar. No trato gastrointestinal o metabólito conjugado inativo sofre a ação de bactérias produtoras de  $\beta$ -glicuronidases, é então reativado e reabsorvido (KANEDA *et al.*, 1990; TAKASUNA *et al.*, 1996; BRANDI *et al.*, 2006). Gupta e colaboradores (1994) estabeleceram uma relação linear entre o índice de concentração biliar de metabólitos do irinotecano e a toxicidade gastrointestinal.

Entretanto, Wong (2013) demonstrou que a injeção local do SN-38 em alças intestinais não causa secreção intestinal em camundongos. Contudo, o metabólito ativo SN3-8 é capaz de induzir aumento da atividade de mieloperoxidase, um indicador da infiltração de neutrófilos, evidenciando assim um claro componente pró-inflamatório. Entretanto, o

irinotecano utilizado como controle experimental, é capaz de induzir um aumento da secreção intestinal na alça isolada, sugerindo o potencial secretório da administração aguda do irinotecano, observado nesse modelo, o que já é descrito na literatura como um efeito colinérgico direto desse fármaco atribuído à porção 4-piperidino-piperidina (HYATT *et al.*, 2005).

Na prática clínica, um dos sinais que significativamente acometem os pacientes é a perda de peso. Os pacientes podem perder peso devido a muitos fatores que reduzem a ingestão de alimentos, como náuseas, vômito, tumores do trato gastrointestinal, fatores iatrogênicos (incluindo fármacos citotóxicos antitumorais), diarreia, dor ou por fatores psicológicos, acometendo aproximadamente 80% dos pacientes com câncer avançado (NELSON *et al.*, 1994, revisto por ALBERICI PASTORE *et al.*, 2013). Clinicamente, estudos mostram que a perda de peso é uma consequência relevante em pacientes com câncer intestinal tratados com o protocolo FOLFIRI (TOURÉ *et al.*, 2012). LIMA (2004) demonstrou que há uma clara redução da ingestão de alimentos e água em animais administrados com metotrexato (LIMA, 2004), um antimetabólito utilizado no tratamento de pacientes com câncer, como de mama, bexiga e cabeça e pescoço (BUZAID *et al.*, 2012) Em nosso protocolo experimental, evidenciamos uma significativa perda de peso dos animais injetados com a associação irinotecano + 5-FU.

Doses elevadas dos quimioterápicos administrados isoladamente também têm sido associadas a uma perda ponderal relevante em animais (MELO, 2007; WONG, 2013; SOARES *et al.*, 2008). Nos estudos de MELO (2007) e WONG (2013), o tratamento com irinotecano provocou perda ponderal significativa de forma tempo-dependente a partir do quarto dia após o início do tratamento. De forma similar, SOARES *et al.* (2008) mostrou que a administração de 150 mg/Kg de 5-FU causou a perda de massa corpórea dos animais no 3º, 5º e 15º dia após a injeção. Isso corrobora com os dados obtidos em nosso estudo.

Quanto à modulação farmacológica como fator protetor contra a variação de perda ponderal, MELO (2008) cita que a utilização de pentoxifilina, uma xantina inibidora da síntese de citocinas, como o TNF- $\alpha$  e a IL-1, conseguiu reverter a perda ponderal. Enquanto que a talidomida, que aumenta a degradação do RNAm do TNF- $\alpha$ , não conseguiu reverter esse parâmetro. Esses fatos podem sugerir que citocinas tem um papel significativo sobre a perda de massa corpórea. De fato, o TNF- $\alpha$  tem reconhecido papel dose-dependente em



causar a redução do peso corpóreo acompanhado pela redução da ingestão de água e alimentos em animais (efeito anoréxico) (MAHONY *et al.*, 1988). Em nosso trabalho encontramos níveis elevados de TNF- $\alpha$  na mucosa intestinal dos animais injetados com a associação de irinotecano + 5-FU. Assim, compreendemos que o processo inflamatório associado à mucosite possa, em associação à diarreia, contribuir significativamente para a perda ponderal dos animais.

Quanto à mortalidade, observou-se em FIGUEIREDO (2012) e MELO (2008) que os animais administrados com irinotecano apresentam uma mortalidade significativa. Em nosso estudo, a associação apresentou a maior taxa de mortalidade sugerindo que a associação de doses também leva a uma mortalidade dose dependente, sendo doses baixas dos quimioterápicos, administrados isoladamente, incapazes de causar mortalidade significativa. Em nosso estudo, em cada protocolo de indução da mucosite intestinal foi realizada um curva de mortalidade a fim de se analisar a mortalidade dos camundongos. Após a definição da dose ideal, observamos que a mortalidade teve início no oitavo dia experimental, sendo de 100% no nono dia. Esse fato também foi decisivo para escolha do sétimo dia como o dia ideal para o sacrifício, pois esse dia apresentou mortalidade de 0% dos animais. Aliado a isso, inclui-se o fato de terem sido observadas uma diarreia importante e perda ponderal no grupo associado, o que foi significativamente maior que o grupo controle injetado apenas com salina.

A mortalidade é indício da toxicidade do fármaco. Em nosso caso, da associação entre irinotecano e 5-fluorouracil. Se uma dose causa alta mortalidade, ela não é a dose ideal para o estudo, pois animais são necessários para a coleta de amostras para a continuação do estudo em modelos animais. Clinicamente esse parâmetro é importante, pois determina a parada dos protocolos clínicos, caso as doses se correlacionem com toxicidades sistêmicas que podem ter como desfecho final uma possível mortalidade (revisto por GIBSON *et al.*, 2013). Desta forma, antes do dia de maior mortalidade dos animais (oitavo para nono dia), optou-se por padronizar a eutanásia dos animais no sétimo dia, quando ainda não se verificava uma mortalidade significativa.

Após a padronização do modelo, com doses e dia de eutanásia definidos, realizou-se o sacrifício dos animais a fim de coletarmos amostras para dosagens subsequentes (LIMA, 2004; MELO, 2007, LIMA-JÚNIOR, 2008, WONG, 2012). Em seguida a montagem do

nosso modelo se baseou na utilização de ensaios histopatológicos, morfométricos, inflamatórios e da avaliação da leucopenia.

Observaram-se, em nosso estudo, alterações morfométricas e histopatológicas secundárias à injeção da associação irinotecano + 5-Fluorouracil, que causou uma diminuição significativa do tamanho das vilosidades, evidências de necrose das células das criptas com vacuolização e presença de infiltrado inflamatório semelhante ao achado de LIMA-JUNIOR (2008) para o irinotecano, referindo serem essas alterações dose-dependentes. Esses achados são corroborados por outros estudos de nosso grupo. Trabalho realizado por LIMA, em 2004, utilizando o metotrexato, mostrou que no grupo tratado apenas com salina não houve alterações relacionadas às vilosidades e criptas, apresentando-se essas estruturas integras, com epitélio cilíndrico recobrando os vilos intestinais e a estrutura intacta das criptas com células de Paneth diferentemente do que foi observado no grupo administrado como metotrexato no qual houve perda da integridade do epitélio intestinal.

Trabalho de MELO, 2007, cita que nos grupos injetados com irinotecano isoladamente em dose elevada, o epitélio apresentou alterações como o encurtamento das vilosidades e aprofundamento das criptas nas três porções intestinais de forma dose-dependente principalmente da porção do íleo seguido do jejuno e duodeno. Isso corrobora nossos achados nos quais a razão vilosidade-cripta diminuiu principalmente no íleo e jejuno. Reforçando esses achados, WONG (2013) mostrou que o irinotecano promoveu uma marcante redução da razão vilosidade/cripta do duodeno, jejuno e íleo em que se verificaram uma destruição da arquitetura dos vilos e criptas, presença de células polimorfonucleares e necrose de células da cripta versus o grupo salina. SOARES (2008), ao injetar 5-FU na dose de 150 mg/kg em ratos, demonstrou que este leva ao encurtamento das vilosidades, aprofundamento das criptas e diminuição da razão vilosidade/cripta em todos os segmentos intestinais estudados. Em camundongos Balb/C e C57BL/6, nos quais se injetou 5-FU 150 ou 450 mg/kg, somente a maior dose provocou lesões intestinais mais intensas no duodeno, jejuno e íleo de forma similar ao evidenciado nos ratos (SOARES, 2008). Associado às alterações morfológicas descritas, houve significativo infiltrado inflamatório polimorfonuclear em todos os estudos que utilizaram os fármacos isoladamente (LIMA, 2004; MELO, 2007; LIMA-JUNIOR, 2008; SOARES, 2008; WONG, 2012). É importante citar que tais alterações histopatológicas e morfométricas em pacientes (KEEFE *et al.*, 2000) são bastante correlacionadas com o desenvolvimento de diarreia, descrita na prática clínica (KEEFE *et al.*, 2007).

O infiltrado inflamatório tecidual é um componente central na resposta imune, estando envolvido no processo de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e liberação de mediadores inflamatórios (ABBAS & LICHTMAN, 2011). Em nosso trabalho, evidenciou-se um acúmulo significativo de neutrófilos em todos os segmentos intestinais após a administração da associação irinotecano + 5-FU.

Como demonstrado em outros estudos, incluindo muitos de nosso laboratório, a resposta inflamatória é um componente de extrema relevância para a lesão intestinal na mucosite e que a modulação de mediadores inflamatórios é peça chave na prevenção do dano, investigamos o nível de infiltração celular polimorfonuclear (neutrófilos) e a produção local de mediadores cuja relevância na patogênese da mucosite tem sido implicada.

A resposta inflamatória intensa observada na mucosa intestinal e representada pela elevada presença de leucócitos no tecido ocorre a despeito da diminuição acentuada do número de leucócitos circulantes presentes na corrente sanguínea dos animais. Isto pode ser explicado pelo fato de que o número de leucócitos presente nos vasos está principalmente localizado às margens do vaso (*pool* marginal de leucócitos) aderidos ao endotélio. Esses leucócitos não são passíveis de mensuração pela simples análise hematológica.

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e KC, um análogo de IL-8 em camundongos) apresentam-se elevados em amostras duodenais de animais injetados com irinotecano (MELO *et al.*, 2008; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2012). Sugere-se que estas citocinas estão envolvidas na patogênese da mucosite intestinal uma vez que o tratamento dos camundongos com pentoxifilina, um inibidor não seletivo de citocinas, e talidomida, um inibidor de TNF- $\alpha$ , impediu os efeitos inflamatórios e danos teciduais (encurtamento dos vilos, perda da arquitetura das criptas e infiltrado inflamatório na lamina própria) provocados pela administração de irinotecano, apesar de o fármaco talidomida não ter melhorado o parâmetro diarreia (MELO, 2008). Corroborando os achados anteriores, FIGUEIREDO (2012) demonstrou que o infliximabe, um anticorpo anti-TNF- $\alpha$  inibiu de forma bastante pronunciada a resposta inflamatória intestinal, sem modular a diarreia.

MELO *et al.* (2008) mostraram, ainda, que irinotecano aumentou de modo significativo os níveis de TNF- $\alpha$  no tecido intestinal nos dias 5 e 7 após início de tratamento como o quimioterápico. Este aumento foi observado para a interleucina IL-1 somente no

sétimo dia de tratamento sugerindo fortemente que as citocinas tem um perfil temporal de expressão. Esse fato explicaria em nosso estudo o motivo pelo qual no sétimo dia encontramos níveis elevados de apenas TNF- $\alpha$  e IL-6, sem variação nos níveis de IL-1 em relação ao grupo salina. Possivelmente em nosso protocolo de estudo as citocinas envolvidas naquele momento experimental sejam TNF- $\alpha$  e IL-6 sendo a expressão de IL-1 deflagrada em momento distinto, talvez antes ou depois das demais. Assim, não se pode descartar a participação desta interleucina na patogênese da mucosite em nosso modelo.

LOGAN *et al.* (2008) cita a importância do fator de transcrição NF- $\kappa$ B na mucosite intestinal. Com a administração de 200 mg/kg de irinotano em ratos esse autor observou significativa marcação para esse fator na mucosa oral, jejuno e cólon. No jejuno a marcação foi observada em todos os tempos da curva temporal realizada. A marcação imunohistoquímica de TNF- $\alpha$  também foi observada em todos os três tecidos estudados como uma marcação proporcional à expressão de NF- $\kappa$ B nos tecidos de intestino analisadas. Também foi observada marcação para IL-1 e IL-6 em todas as porções do intestino estudadas. A marcação de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , também foi observada em fibroblastos e células inflamatórias nos tecidos examinados.

No trabalho acima, realizou-se uma curva temporal para avaliar a marcação de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 e observou-se o pico na marcação de NF- $\kappa$ B e das citocinas pró-inflamatórias 6h após a administração de irinotecano coincidindo com o momento da ocorrência de alterações histológicas e diarreia. No entanto, o trabalho mostra que a marcação de NF- $\kappa$ B e das citocinas pró-inflamatórias permaneceram elevadas durante toda a curva temporal que se estendeu até 72 h (LOGAN *et al.* 2008)

A importância do fator de transcrição NF- $\kappa$ B na mucosite também é mostrada por SONIS (2004). Os quimioterápicos, no nosso caso irinotecano e 5-FU, provocariam um dano direto ao epitélio e tecido subjacente. O dano seria uma variedade de mecanismos como aqueles mediados por espécies reativas de oxigênio (EROs) que ativariam o NF- $\kappa$ B e causariam dano ao epitélio. Quanto ao dano ao DNA, isso provocaria lesão na célula e culminaria com morte celular. Já quanto ao dano direto, isso provocaria a ativação de células como o macrófagos, levando a uma ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B que leva a *upregulation* de genes que modulam a resposta inflamatória levando ao aumento de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , causando ainda mais dano aos tecidos. Além disso, essas citocinas pró-

inflamatórias participam de uma via de retroalimentação positiva causando uma maior ativação de NF- $\kappa$ B e subsequente produção de citocinas o que amplificaria a cascata de eventos que causam danos aos tecidos. O dano tecidual pode permitir a colonização por bactérias aumentando o risco de infecções generalizadas. Adicionalmente, produtos bacterianos podem estimular a amplificação de citocinas potencializando o dano tecidual (LOGAN, 2007; SONIS, 2004)

NISHIMOTO & KISHIMOTO (2004) comenta o papel da IL-6 sobre doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn, citando que essa citocina está elevada no soro e nos tecidos intestinais de pacientes com a doença, sugerindo que a IL-6 tem um papel crucial na patogênese das doenças inflamatórias intestinais. Nesse sentido, BERNARDO *et al.* (2012) demonstraram a importância da IL-6 na colite ulcerativa, estando esta citocina predominantemente encontrada nas áreas inflamadas obtidas de biópsias intestinais de pacientes com colite. Naquele estudo, a concentração tecidual correlaciona-se com o resultado endoscópico utilizado para avaliar a gravidade da doença. O papel da IL-6, portanto, foi demonstrado pelo uso de um anticorpo anti-IL-6 aplicado às culturas celulares das biópsias dos pacientes, mostrando um bloqueio de forma eficaz dos níveis de IL-6 e de outras citocinas, como IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-7. Adicionalmente, a suplementação de meios de cultura de biópsias de áreas intestinais não inflamadas coletadas dos mesmos pacientes com IL-6 levou ao aumento da produção de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-7, IL-4, IL-13 e IL-17 no sobrenadante das culturas (BERNARDO *et al.*, 2012).

Padrões diferentes de resposta imune adaptativa são orquestrados por subpopulações distintas de célula T. As reações imunes podem ser frequentemente determinadas por umas das populações de linfócitos T presentes no organismo, Th1, Th2 ou mais recentemente Th17. Inicialmente, os linfócitos T CD4+ helper (Th) foram divididos em duas subpopulações, Th1 e Th2, com base no perfil de citocinas produzidas em murinos (MOSMANN *et al.*, 1986) e, posteriormente, em humanos (LIEW, 2002).

A subclasse Th17 foi descoberta recentemente, a partir do trabalho de PARK *et al.* (2005), o qual demonstrou a existência de uma linhagem distinta de célula T CD4+ produtora de IL-17. Essas células expressam o receptor nuclear ROR $\gamma$ t que é fortemente induzido na presença de TGF- $\beta$  e IL-6 (DAMSKER; HANSEN; CASPI, 2009; KORN *et al.*, 2009). A IL-17 possui efeito sobre muitos tipos celulares, tais como fibroblastos, células endoteliais,

células epiteliais, queratinócitos e macrófagos; induzindo a produção de IL-6, G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos) e TNF- $\alpha$  (DAMSKER; HANSEN; CASPI, 2009).

O aparecimento de células Th17 depende de citocinas pro-inflamatórias, como IL-6, produzidas em resposta a bactérias e fungos (ABBAS & LICHTMAN, 2011). A IL-6 tem papel preponderante na promoção da produção de anticorpos por linfócitos B ativados e na polarização dos linfócitos T no perfil Th17. Esse perfil de linfócito é responsável pela produção de IL-17 e essa interleucina induz reações inflamatórias ricas em neutrófilos (ABBAS & LICHTMAN, 2011). Sabendo que o perfil Th17 tem importância em distúrbios de natureza inflamatória intestinal, isso corrobora com nosso estudo no qual foi encontrado um intenso infiltrado neutrofílico no duodeno, jejuno e íleo.

A resposta mediada por células Th1, Th2 e Th17 contribui para patogênese de várias doenças inflamatórias do trato gastrointestinal. Na doença de Crohn a resposta de células Th1, guiada pela produção aumentada de IL-18 e IL-12 na mucosa, desempenha um papel patogênico no processo lesivo (PODOLSKY, 2002). Na colite ulcerativa, observa-se o papel patogênico de células Th2, com produção excessiva de IL-5 e IL-13 (GEREMIA *et al.*, 2013), bem como de células Th17. O aumento na frequência destas células foi observado na mucosa de pacientes com colite ulcerativa e doença de Crohn (SYMONS; BUDELSKY; TOWNE, 2012).

Portanto, como visto em nosso trabalho, a alta produção intestinal de IL-6 pode, pelo menos em parte, estar contribuindo para um padrão de ativação linfocitário Th17 na mucosa, o que merece investigações adicionais para corroborar tais sugestões.

Quanto à contagem de total de leucócitos sabe-se que a utilização de quimioterápicos causa leucopenia, uma vez que estes fármacos quimioterápicos apresentam um efeito supressor sobre a medula óssea, mielotoxicidade (CALABRESI & CHABNER, 2012).

Observou-se uma diminuição da contagem total de leucócitos em animais tratados com quimioterapia para indução de mucosite intestinal se comparado com os grupos tratados apenas com salina. Esse efeito pode ser observado em diferentes protocolos para indução de mucosite: metotrexato (LIMA, 2004), irinotecano (LIMA-JUNIOR, 2008) e 5-Fluorouracil (SOARES, 2008). WONG (2013) observou que o irinotecano induziu uma significativa leucopenia no quinto (43,5%) e no sétimo dia (66,2%) quando comparado ao grupo salina.

Em seu estudo, SOARES (2008) observou que houve redução no número de leucócitos de forma dose dependente com maior leucopenia na dose de 450 mg/Kg de 5-Fluorouracil em ambas as espécies animais utilizadas no estudo. A leucopenia também foi observada em nosso estudo onde o número de leucócitos no grupo administrado com a associação de irinotecano e 5-Fluorouracil foi reduzido significativamente se comparado ao grupo administrado apenas com salina, análogo ao observado na prática clínica (BLIJLEVENS, 2007).

A toxicidade do irinotecano e 5-Fluorouracil está bem descrita na prática clínica, sendo a mucosite intestinal um efeito colateral significativo que, como já dito, pode comprometer o tratamento dos pacientes e aumentar os custos. Contudo, ainda não existe tratamento realmente eficaz para essa condição ou tratamento preventivo. Além disso, apesar dos vários estudos realizados nos últimos anos com relação à patogênese da mucosite induzida pela quimioterapia antineoplásica, ainda há muito para se agregar a esse conhecimento. Compreendemos, portanto, que com nosso estudo pudemos avançar um passo a mais nesse contexto.

## 7. CONCLUSÃO

Nesse estudo padronizamos um novo modelo experimental de mucosite intestinal induzida pela associação de Irinotecano (45 mg/Kg) e 5-Fluorouracil (37,5 mg/Kg) em camundongos C57BL/6 administrados por 4 dias consecutivos.

Observamos que a associação provocou aumento da mortalidade dos animais, perda de massa corpórea, aumento significativo dos escores de diarreia, leucopenia, alterações quanto ao tamanho das vilosidades e criptas e necrose de criptas. Além disso, foi observado aumento do infiltrado inflamatório representado pelo aumento da atividade de mieloperoxidase e aumento nos níveis das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6.

Através desses parâmetros definimos as doses mais adequadas para a reprodução do modelo e via ideal. O modelo é considerado o mais apropriado para o estudo da mucosite intestinal causada por quimioterápicos, pois é o que mais se aproxima ao que ocorre clinicamente, quando em geral são utilizados dois fármacos para o tratamento do câncer coloretal. Isso é extremamente relevante dado o fato dos efeitos apresentados por fármacos isolados serem, em parte, diversos aos observados na associação.

Espera-se que este modelo permita de fato uma melhor compreensão dos eventos que ocorrem durante a mucosite intestinal. Além disso, como perspectiva futura, desejamos estudar alguns mecanismos moleculares relacionados a essa patologia.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS AK, LICHTMAN AH. **Imunologia celular e molecular**. 5ª Edição. Rio de Janeiro, Saunders Elsevier, 2011.
- AJANI JA. Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. **Oncologist**. 10 Suppl 3:49-58. 2005.
- ALBERICI PC, PAIVA OS, GONZÁLEZ MC. Association between an inflammatory-nutritional index and nutritional status in cancer patients. **Nutr Hosp**. 28(1):188-93. Jan-Feb, 2013.
- AL-DASOOQI N, BOWEN JM, GIBSON RJ, LOGAN RM, STRINGER AM, KEEFE DM. Irinotecan-induced alterations in intestinal cell kinetics and extracellular matrix component expression in the dark agouti rat. **Int J ExpPathol**. 92:357-65. 2011.
- ALIMONTI A, SATTA F, PAVESE I, BURATTINI E, ZOFFOLI V, VECCHIONE A. Prevention of irinotecan plus 5-fluorouracil/leucovorin-induced diarrhoea by oral administration of neomycin plus bacitracin in first-line treatment of advanced colorectal cancer. **Ann Oncol**. 14:805-6. 2003.
- ALIMONTI A, GELIBTER A, PAVESE I, SATTA F, COGNETTI F, FERRETTI G, RASIO D, VECCHIONE A, DI PALMA M. New approaches to prevent intestinal toxicity of irinotecan-based regimens. **Cancer Treat Rev**. 30(6):555-62. Oct, 2004.
- ALVES-FILHO JC, DE FREITAS A, RUSSO M, CUNHA FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis. **Crit Care Med**. 34(2):461-70. Feb, 2006.
- BALLERINI G, BOSI L, CASTOLDI GL, RICCI N. Experimental enteropathy induced by 5-fluorouracil in the rat. **Boll Soc Ital Biol Sper**. 30; 37:578-80. Jun, 1961.
- BERETTA GD, PETRELLI F, STINCO S, CABIDDU M, GHILARDI M, SQUADRONI M, BORGONOVO K, BARNI S. FOLFIRI + bevacizumab as second-line therapy for metastatic colorectal cancer pretreated with oxaliplatin: a pooled analysis of published trials. **MedOncol**. 30(1):486. Mar, 2013.

- BERNARDO D, VALLEJO-DÍEZ S, MANN ER, AL-HASSI HO, MARTÍNEZ-ABAD B, MONTALVILLO E, TEE CT, MURUGANANTHAN AU, NÚÑEZ H, PEAKE ST, HART AL, FERNÁNDEZ-SALAZAR L, GARROTE JA, ARRANZ E, KNIGHT SC. IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and Tcells they stimulate. **Eur J Immunol.** 42(5):1337-53. May, 2012.
- BLEIBERG H, CVITKOVIC E. Characterisation and clinical management of CPT-11 (irinotecan)-induced adverse events: the European perspective. **Eur J Cancer.** 32A Suppl 3:S18-23. 1996.
- BLIJLEVENS N, SONIS S. Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. **Ann Oncol.** 18(5):817-26. May, 2007
- BOWEN JM, STRINGER AM, GIBSON RJ, YEOH AS, HANNAM S, KEEFE DM. VSL#3 probiotic treatment reduces chemotherapy-induced diarrhea and weight loss. **Cancer BiolTher.** 6(9): 1449–1454. 2007.
- BOWEN JM, GIBSON RJ, KEEFE DMK. Animal Models of Mucositis: Implications for Therapy. **J Support Oncol.** Volume 9, Number 5, 161–168. September/October, 2011.
- BRANDI G, DABARD J, RAIBAUD P, DI BATTISTA M, BRIDONNEAU C, PISI AM, MORSELLI LABATE AM, PANTALEO MA, DE VIVO A, BIASCO G. Intestinal microflora and digestive toxicity of irinotecan in mice. **Clin Cancer Res.** 15; 12(4):1299-307. Feb, 2006.
- BUZAID AC, MALUF FC, ROCHA-LIMA CM. **Mini-MOC – Pocket book do Manual de Oncologia Clínica do Brasil.** 5ª Edição. São Paulo. Dendrix Edição e Design Ltda. 2012
- CALABRESI P, CHABNER BA. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: HARDMAN JG, LIMBIRD LE, MOLINONOFF PB. **Goodman & Gilman: as bases**

**farmacológicas da terapêutica.** 10<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana. 2012.

CARNEIRO-FILHO BA, LIMA IP, ARAUJO DH, CAVALCANTE MC, CARVALHO GH, BRITO GA, LIMA V, MONTEIRO SM, SANTOS FN, RIBEIRO RA, LIMA AA. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. **Dig Dis Sci.** 49(1):65-72. Jan, 2004.

CHEN D, WU G, WANG W, WANG J. Neutrophil infiltration is involved in 5-fluorouracil induced lipid peroxidative damage of the small intestine. **Chin Med Sci J.** 12(3):181-3. Sep, 1997.

CHESTER JD, JOEL SP, CHEESEMAN SL, HALL GD, BRAUN MS, PERRY J, DAVIS T, BUTTON CJ, SEYMOUR MT. Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. **J ClinOncol.** 15; 21(6):1125-32. Mar, 2003.

CHU E. Drug development. In: DEVITA Jr VT, HELLMAN S, ROSENBERG SA. **Cancer: principles and practice of oncology, pancreatic cancer.** 7. ed. Philadelphia. Lippincott Williams e Wilkins. 2005.

CUNNINGHAM D, PYRHONEN S, JAMES RD, PUNT CJ, HICKISH TF, HEIKKILA R, JOHANNESSEN TB, STARKHAMMAR H, TOPHAM CA, AWAD L, JACQUES C, HERAIT P. Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. **Lancet.** 352:1413–1418. 1998.

CURRERI AR, ANSFIELD FJ, HARRY FAM, WAISMAN HA, HEIDELBERGER C. Clinical Studies with 5-Fluorouracil. **Cancer Res.** 18:478-484. 1958.

DAMSKER JM; HANSEN AM; CASPI RR. Th1 and Th17 cells. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1183 211–221. 2010.

DE JONGE MJA, SPARREBOOM A AND VERWEIJ J. The development of combination therapy involving camptothecins: a review of preclinical and early clinical studies. **Cancer Treatment Reviews.** 24: 205–220. 1998.

- DEMEDTS I, GEBOES K, KINDT S, VANDEN BERGHE P, ANDRIOLI A, JANSSENS J, TACK J. Neural mechanisms of early postinflammatory dysmotility in rat small intestine. **Neurogastroenterol Motil.** 18(12):1102-11. Dec, 2006.
- DODDS HM, HAAZ MC, RIOU JF, ROBERT J, RIVORY LP. Identification of a New Metabolite of IRINOTECANO (Irinotecan): Pharmacological Properties and Activation to SN-381. **JPET.** 286:578–583. 1998.
- DODDS HM, RIVORY LP. The mechanism for the inhibition of acetylcholinesterases by irinotecan (IRI). **Mol Pharmacol.** 56(6):1346-53. Dec, 1999.
- DOUILLARD JY, CUNNINGHAM D, ROTH AD, NAVARRO M, JAMES RD, KARASEK P, JANDIK P, IVESON T, CARMICHAEL J, ALAKL M, GRUIA G, AWAD L, ROUGIER P. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomised trial. **The Lancet.** Volume 355, Issue 9209, Pages 1041 – 1047. March, 2000.
- ELTING LS, COOKSLEY C, CHAMBERS M, CANTOR SB, MANZULLO E, RUBENSTEIN EB. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer.** 98 (7): 1531-1539. 2003.
- ELTING LS, COOKSLEY CD, CHAMBERS MS, GARDEN AS. Risk, outcomes, and costs of Radiation-Induced Oral Mucositis among patients with head-and-neck malignancies. **Int J RadiatOncolBiolPhys.** 68(4):1110-20. 2007.
- FERLAY J, SHIN H, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN DM. Estimates of worldwide burden of cancer: GLOBOCAN 2011. **Int J Cancer.** 127:2893-917. 2011.
- FIELD M. Intestinal ion transport an the pathophysiology on the diarrhea. **J Clin Invest.** 111: 931-43. 2003.
- FIGUEIREDO AA. **Efeito do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , infliximabe, sobre a mucosite intestinal experimental induzida por Irinotecano.** Dissertação [Mestrado em Cirurgia]. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

- FILICKO J; LAZARUS H M; FLOMENBERG N. Mucosal injury in patients undergoing hematopoietic progenitor cell transplantation: new approaches to prophylaxis and treatment. **Bone Marrow Transplant.** 31, 1–10. 2003.
- FUJII H, KOSHIYAMA M, KONISHI M, YOSHIDA M, TAUCHI K. Intermittent, repetitive administrations of irinotecan (IRINOTECANO) reduces its side-effects. **Cancer Detect Prev.** 26(3):210-2. 2002.
- GANDIA D, ABIGERGES D, ARMAND JP, CHABOT G, DA COSTA L, DE FORNI M, MATHIEU-BOUE A, HERAIT P. CPT-11-induced cholinergic effects in cancer patients. **J Clin Oncol.** 11(1):196-7. Jan, 1993.
- GEREMIA A, BIANCHERI P, ALLAN P, CORAZZA GR, DI SABATINO A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmun Rev.** Jun, 2013.
- GIACCHETTI S, PERPOINT B, ZIDANI R, LE BAIL N, FAGGIUOLO R, FOCAN C, CHOLLET P, LLORY JF, LETOURNEAU Y, COUDERT B, BERTHEAUT-CVITKOVIC F, LARREGAIN-FOURNIER D, LE ROL A, WALTER S, ADAM R, MISSET JL, LÉVI F. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. **J. Clin. Oncol.** 18, 136–147. 2000.
- GIBSON RJ, BOWEN JM, INGLIS MR, CUMMINS AG, KEEFE DM. Irinotecan causes severe small intestinal damage, as well as colonic damage, in the rat with implanted breast cancer. **J Gastroenterol Hepatol.** 18(9):1095-100. Sep, 2003.
- GIBSON RJ, BOWEN JM, CUMMINS AG, KEEFE DM. Relationship between dose of methotrexate, apoptosis, p53/p21 expression and intestinal crypt proliferation in the rat. **ClinExp Med.** 4(4):188-95. Mar, 2005.
- GIBSON RJ, KEEFE DM. Cancer chemotherapy- induced diarrhea and constipation: Mechanisms of damage and prevention strategies. **Support Care Cancer.** 14:890- 900. 2006.
- GIBSON RJ, BOWEN JM, ALVAREZ E, FINNIE J, KEEFE DM. Establishment of a single-dose irinotecan model of gastrointestinal mucositis. **Chemotherapy.** 53(5):360-9. 2007.

GIBSON RJ, KEEFE DM, LALLA RV, BATEMAN E, BLIJLEVENS N, FIJLSTRA M, KING EE, STRINGER AM, VAN DER VELDEN WJ, YAZBECK R, ELAD S, BOWEN JM; Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of agents for the management of gastrointestinal mucositis in cancer patients. **Support Care Cancer**. 21(1):313-26. Jan, 2013.

GIFONI MA. **Mucosite e alterações de permeabilidade intestinal em pacientes portadores de Câncer Colorretal Metastático tratados com 5-fluorouracil (5-FU) e Irinotecano (CPT-11)**. Tese [Doutorado em Oncologia]. Fundação Antônio Prudente. Fortaleza, 2012.

GRAF W, WEIBER S, JIBORN H, PÅHLMAN L, GLIMELIUS B, ZEDERFELDT B. The roles of nutritional depletion and drug concentration in 5-fluorouracil-induced inhibition of colonic healing. **J Surg Res**. 56(5):452-6. May, 1994.

GUIMARÃES, J.L.M.; ROSA, D.D. **Rotinas em oncologia**. 1<sup>a</sup> Edição. Porto Alegre Artmed. 2008.

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

GUPTA E, LESTINGI TM, MICK R, RAMIREZ J, VOKES EE, RATAIN MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. **Cancer Res**. 54: 3723-3725. 1994.

HYATT JL, TSURKAN L, MORTON CL, YOON KJ, HAREL M, BRUMSHTEIN B, SILMAN I, SUSSMAN JL, WADKINS RM, POTTER PM. Inhibition of acetylcholinesterase by the anticancer prodrug CPT-11. **Chem Biol Interact**. 157-158: 247-52. 2005.

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**. 87:1876-88. 1995.

- IMPACT. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. **Lancet**. 345, 939–944. 1995.
- INCA. **Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2012**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp>. Acesso em: 01/01/13.
- IRVIN WP, PRICE FV, BAILEY H, GELDER M, ROSENBLUTH R, DURIVAGE HJ, POTKUL RK. A phase II study of irinotecan (IRINOTECANO) in patients with advanced squamous cell carcinoma of the cervix. **Cancer**. 15; 82(2):328-33. Jan, 1998.
- IYER L, KING CD, WHITINGTON PF, GREEN MD, TEPHLY TR, COFFMAN BL AND RATAIN MJ. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecano (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-28) in human liver microsomes. **Journal of Clinical Investigations**. 101:847–854. 1998.
- JOHNSTON PG & KAYE S. Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. **Anticancer Drugs**. 12, 639–646. 2001.
- KANEDA N., NAGATA H., FURUTA T., YOKOKURA T. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. **Cancer Res**. 50: 1715-1720. 1990.
- KEEFE DMK. **The effect of cytotoxic chemotherapy on the mucosa of the small intestine**. Thesis. Depts. of Gastroenterology and Haematology/Oncology, University of Adelaide. 1998.
- KEEFE DM, BREALEY J, GOLAND GJ, CUMMINS AG. Chemotherapy for cancer causes apoptosis that precedes hypoplasia in crypts of the small intestine in humans. **Gut**. 47 (5):632– 637. 2000.
- KEEFE DM, SCHUBERT MM, ELTING LS, SONIS ST, EPSTEIN JB, RABER-DURLACHER JE, MIGLIORATI CA, MCGUIRE DB, HUTCHINS RD, PETERSON DE; Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice

guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer**. 1; 109(5):820-31. Mar, 2007.

KEEFE DM *et al.* Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. **Cancer**. 109:820–31. 2007.

KELLY C, CASSIDY J. Chemotherapy in metastatic colorectal cancer. **Surgical Oncology**. 16, 65–7. 2007.

KOENIG H, PATEL A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. The role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. **Arch neurol**. v.23 (2), p. 155-160. 1970.

KÖHNE CH, SCHÖFFSKI P, WILKE H, KÄUFER C, ANDREESEN R, OHL U, KLAASEN U, WESTERHAUSEN M, HIDDEMANN W, SCHOTT G, HARSTICK A, BADE J, HORSTER A, SCHUBERT U, HECKER H, DÖRKEN B, SCHMOLL HJ. Effective biomodulation by leucovorin of high-dose infusion fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion: results of a randomised trial in patients with advanced colorectal cancer. **J Clin Oncol**. 16: 418–26. 1998.

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**. 27: 485-517. 2009.

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**. 46 (3):211-20. 2000.

LANGER CJ. Irinotecan in advanced lung cancer: focus on North American trials. **Oncology (Williston Park)**. 18 (7 Suppl 4):17-28. 2004.

LARA LM, CADENA JJ, ECHEVERRY SX. La mucositis y su tratamiento. Protocolos de manejo y recomendaciones. **Revista Estomatología**. 15(1):29-3. 2007.

LEITAO RF, BRITO GA, ORIA RB, BRAGA-NETO MB, BELLAGUARDA EA, SILVA LR, FREIRE RS, VALE ML, RIBEIRO RA. Role of inducible nitric oxide synthase



pathway on methotrexate-induced intestinal mucositis in rodents. **BMC Gastroenterol.** 16: 11-90. 2011.

LIEW FY. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. **Nat Rev Immunol.** 2(1):55-60. Jan, 2002.

LIMA V. **Evidências da participação de TNF- $\alpha$  e COX-2 nas mucosites oral e intestinal induzidas por 5-fluorouracil e metotrexato em animais.** Tese [Doutorado em Farmacologia]. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza; 2004.

LIMA-JUNIOR RC. **Estudo morfofuncional e dos mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida por irinotecano (CPT-11) em camundongos: Papel da Caspase-1, Interleucina-18 e óxido nítrico.** Tese [Doutorado em Farmacologia]. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza; 2008.

LIMA-JUNIOR RC, FIGUEIREDO AA, FREITAS HC, MELO ML, WONG DV, LEITE CA, MEDEIROS RP, MARQUES-NETO RD, VALE ML, BRITO GA, ORIÁ RB, SOUZA MH, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer Chemother Pharmacol.** 69(4):931-42. 2012.

LOGAN RM, STRINGER AM, BOWEN JM, YEOH ASJ, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DM. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. **Cancer Treatment Reviews.** 33, 448–460. 2007.

LOGAN RM, GIBSON RJ, BOWEN JM, STRINGER AM, SONIS ST, KEEFE DM. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucosite. **Cancer Chemother Pharmacol.** 62(1):33-41. 2008.

- LOGAN RM, STRINGER AM, BOWEN JM, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DM. Serum levels of NF $\kappa$ B and drug pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer Biol Ther.** 7 (7): 1139-45. 2008.
- LOGAN RM, STRINGER AM, BOWEN JM, GIBSON RJ, SONIS ST, KEEFE DM. Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered? **Cancer Chemother Pharmacol.** 63(2):239 – 251. 2009.
- LONGLEY DB, HARKIN P, JOHNSTON P. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews Cancer.** 3, 330-338. May, 2003.
- MACEDO LT, LIMA ABC, SASSE AD. Addition of bevacizumab to first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, with emphasis on chemotherapy subgroups. **BMC Cancer.** 12:89. 2012.
- MAHONY SM, BECK SA, TISDALE MJ. Comparison of weight loss induced by recombinant tumour necrosis factor with that produced by a cachexia-inducing tumour. **Br J Cancer.** 57(4):385-9. Apr, 1988.
- MATHIJSSSEN RHJ, JONG FA, VAN SCHAIK RHN, LEPPER ER, FRIBERG LE, RIETVELD T, BRUIJN P, GRAVELAND WJ, FIGG WD, VERWEIJ J, SPARREBOOM A. Prediction of irinotecan pharmacokinetics by use of cytochrome P450 3A4 phenotyping probes. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 96, n. 21, p. 1585-92. 2004.
- MELO ML. **Papel de citocinas, óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 na mucosite intestinal induzida pelo agente antitumoral Cloridrato de irinotecano (CPT-11) – efeito da pentoxifilina, Talidomida e celecoxibe.** Tese [Doutorado em Farmacologia]. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.
- MELO ML, BRITO GA, SOARES RC, CARVALHO SB, SILVA JV, SOARES PM, VALE ML, SOUZA MH, CUNHA FQ, RIBEIRO RA. Role of cytokines (TNF-alpha, IL-1beta and KC) in the pathogenesis of CPT-11-induced intestinal mucositis in mice: effect of pentoxifylline and thalidomide. **Cancer Chemother Pharmacol.** 61(5):775-84. 2008.

- MOSMANN TR, CHERWINSKI H, BOND MW, GIEDLIN MA, COFFMAN RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. **J Immunol.** 1; 175(1):5-14. Jul, 2005.
- NELSON KA, WALSH D, SHEEHAN FA. The cancer anorexia-cachexia syndrome. **J Clin Oncol.** 12(1):213-25. Jan, 1994.
- NISHIMOTO N, KISHIMOTO T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. **Curr Opin Pharmacol.** 4(4):386-91. Aug, 2004.
- PARK H, LI Z, YANG XO, CHANG SH, NURIEVA R, WANG YH, WANG Y, HOOD L, ZHU Z, TIAN Q, DONG C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nat Immunol.** 6:1133–1141. 2005.
- PEREZ EA, HILLMAN DW, MAILLIARD JA, INGLE JN, RYAN JM, FITCH TR, ROWLAND KM, KARDINAL CG, KROOK JE, KUGLER JW, DAKHIL SR. 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.** 22(14):2849-55. 2004.
- PODOLSKY DK. Inflammatory bowel disease. **New Engl J Med.** 8; 347(6):417-29. Aug, 2002.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Quimioterapia do câncer. In. **Farmacologia.** 4ª Edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2008.
- RENATO DANI. Gastroenterologia Essencial. 3ª edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 2006.
- RIBRAG V, KOSCIELNY S, VANTELON JM, FERME C, RIDELLER K, CARDE P, BOURHIS JH, MUNCK JN. Phase II trial of irinotecan (IRINOTECANO) in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma.** 44(9):1529-33. 2003.
- RICHARDSON G, DOBISH R. Chemotherapy induced diarrhea. **J Oncol Pharm Pract.** 13(4):181-98. Dec, 2007.

- RIEZZO G, CLEMENTE C, LEO S, RUSSO F. The role of electrogastrography and gastrointestinal hormones in chemotherapy-related dyspeptic symptoms. **J Gastroenterology**. 40(12):1107-15. Dec, 2005.
- RIVORY LP, BOWLES MR, ROBERT J, POND SM. Conversion of irinotecan (IRINOTECAN) to its active metabolite, 7-ethyl-10-hidroxicamptothecin (SN-38), by human liver carboxylesterase. **Biochem.Pharmacol**. v. 52, n. 7, p. 1103-11. 1996.
- ROCHA-LIMA CM, SHERMAN CA, BRESCIA FJ, BRUNSON CY, GREEN MR. Irinotecan/gemcitabine combination chemotherapy in pancreatic cancer. **Oncology (Williston Park)**. 15 (3 Suppl 5):46-51. Mar, 2001.
- ROCHA-LIMA CM, HERNDON JE 2nd, LEE ME, ATKINS JN, MAUER A, VOKES E, GREEN MR. Cancer and Leukemia Group B. Phase II trial of irinotecan/gemcitabine as second-line therapy for relapsed and refractory small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 39902. **Ann Oncol**. 18 (2):331-7. Feb, 2007.
- ROSATI G, ROSSI A, REGGIARDO G, MANZIONE L. A phase II study of irinotecan alternated with a weekly schedule of high-dose leucovorin and 48-hour 5-fluorouracil infusion in patients with metastatic colorectal cancer. **Oncology**. 62 (3):209-15. 2002.
- RUBENSTEIN EB, PETERSON DE, SCHUBERT M, KEEFE D, MCGUIRE D, EPSTEIN J, ELTING LS, FOX PC, COOKSLEY C, SONIS ST. Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. **Cancer**. 100 (9 Suppl): 2026-46. May, 2004.
- RUTMAN RJ, CANTAROW A, PASCHKIS KE. The catabolism of uracil in vivo and in vitro. **J Biol Chem**. 210 (1):321-9. Sep, 1954.
- SALTZ LB, COX JV, BLANKE C, ROSEN LS, FEHRENBACHER L, MOORE MJ, MAROUN JA, ACKLAND SP, LOCKER PK, PIROTTA N, ELFRING GL, MILLER

- LL. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. **N Engl J Med.** 28; 343 (13): 905-14. Sep, 2000.
- SALTZ LB, DOUILLARD JY, PIROTTA N, ALAKL M, GRUIA G, AWAD L, ELFRING GL, LOCKER PK, MILLER LL. Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin for metastatic colorectal cancer: a new survival standard. **Oncologist.** 6 (1):81-91. 2001.
- SATOH T, HOSOKAWA M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. **Annu Rev PharmacolToxicol.** 38:257-88. 1998.
- SCHMITTEL A, JAHNKE K, THIEL E, KEILHOLZ U. Neomycin as secondary prophylaxis for irinotecan-induced diarrhea. **Ann Oncol.** 15:1296. 2004.
- SCHMITZ J, OWYANG A, OLDHAM E, *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity.** 23:479-90. 2005.
- SCULLY C, SONIS S, DIZ PD. Oral mucositis. **Oral Dis.** 12(3):229-41. May, 2006.
- SOARES PMG. Mucosite intestinal experimental induzida por 5-fluorouracil: Papel de IL-1 $\beta$ , IL-4 e PAF e avaliação das alterações da motilidade digestiva. Tese [Doutorado em Farmacologia]. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza; 2008.
- SOARES PM, MOTA JM, GOMES AS, OLIVEIRA RB, ASSREUY AM, BRITO GA, SANTOS AA, RIBEIRO RA, SOUZA MH. Gastrointestinal dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer Chemother Pharmacol.** 63(1):91-8. Dec, 2008.
- SOARES PM, LIMA-JUNIOR RC, MOTA JM, JUSTINO PF, BRITO GA, RIBEIRO RA, CUNHA FQ, SOUZA MH. Role of platelet-activating factor in the pathogenesis of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** 68 (3):713-20. Sep, 2011.

- SOARES PM, MOTA JM, SOUZA EP, JUSTINO PF, FRANCO AX, CUNHA FQ, RIBEIRO RA, SOUZA MH. Inflammatory intestinal damage induced by 5-fluorouracil requires IL-4. **Cytokine**. 61(1):46-9. Jan, 2013.
- SONIS ST. The pathobiology of mucositis. **Nat Rev Cancer**. 4(4):277–284. 2004.
- STRINGER AM, GIBSON RJ, BOWEN JM, LOGAN RM, YEOH AS, KEEFE DM. Chemotherapy-induced mucositis: the role of gastrointestinal microflora and mucins in the luminal environment. **J Support Oncol**. 5:259-67. 2007.
- STRINGER AM, GIBSON RJ, BOWEN JM, LOGAN ASHTON K, YEOH ASJ, AL-DASOOQUI N, KEEFE DMK. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. **Int J Exp Path**. 90: 489-499. 2009.
- SYMONS A, BUDELSKY AL, TOWNE JE. Are Th17 cells in the gut pathogenic or protective? **Mucosal Immunol**. 5(1):4-6. Jan, 2012.
- TAKASUNA K, HAGIWARA T, HIROHASHI M, KATO M, NOMURA M, NAGAI E, YOKOI T, KAMATAKI T. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. **Cancer Res**. 15; 56(16):3752-7. Aug, 1996.
- TAKASUNA K, KASAI Y, KITANO Y, MORI K, KAKIHATA K, HIROHASHI M, NOMURA M. Study on the mechanisms of diarrhea induced by a new anticancer camptothecin derivative, irinotecanhydrochloride (CPT-11), in rats. **Nihon Yakurigaku Zasshi**. 105 (6):447-60. Jun, 1995.
- TAKASUNA K, HAGIWARA T, WATANABE K, ONOSE S, YOSHIDA S, KUMAZAWA E, NAGAI E, KAMATAKI T. Optimal antidiarrhea treatment for antitumor agent irinotecan hydrochloride (IRINOTECANO)-induced delayed diarrhea. **Cancer Chemother.Pharmacol**. v. 25, p. 1-10. 2006.
- The Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. **J ClinOncol**. 10: 896–903. 1992.

- TOURÉ A, CHAMBRIER C, VANHEMS P, LOMBARD-BOHAS C, SOUQUET JC, ECOCHARD R. Propensity score analysis confirms the independent effect of parenteral nutrition on the risk of central venous catheter-related bloodstream infection in oncological patients. **Clin Nutr.** 32(6):1050-4. Dec, 2012.
- TRIFAN OC, DURHAM WF, SALAZAR VS, HORTON J, LEVINE BD, ZWEIFEL BS, DAVIS TW, MASFERRER JL. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. **Cancer Res.** 15; 62(20):5778-84. Oct, 2002.
- VIDON N, PERCHELLET E, HUCHET B, BERNIER JJ. Hydroelectrolytic movements in rat jejunum during the alterations of the mucosa induced by a single injection of 5-fluorouracil. **Digestion.** 19(6):370-4. 1979.
- VIDON N, PERCHELET E, HUCHET B, BERNIER JJ. Cryptal origin of the intestinal secretion induced in rats by prostaglandin E<sub>1</sub>. Evolution of secretion after a single injection of 5-fluorouracil. **Arch Int Physiol Biochim.** 89(3):249-55. Sep, 1981.
- WEIBER S, GRAF W, GLIMELIUS B, JIBORN H, PÅHLMAN L, ZEDERFELDT B. The effect of 5-fluorouracil on wound healing and collagen synthesis in left colon anatomizes. An experimental study in the rat. **Eur Surg Res.** 26(3):173-8. 1994.
- WHO, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acesso em: 01/01/13.
- WILHELM SM, MCKENNEY KA, RIVAIT KN, KALE-PRADHAN PB. A review of infliximab use in ulcerative colitis. **Clin Ther.** 30(2):223-30. Feb, 2008.
- WONG DVT. Estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite intestinal induzida pelo irinotecano e seu metabólito ativo, SN38: envolvimento dos receptores TLR2, NOD1 e da proteína adaptadora MyD88. Tese [Doutorado em Farmacologia]. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza; 2013.
- WOO PCY, NG WF, LEUNG HCH, TSOI HW, YUEN KY. Clarithromycin attenuates cyclophosphamide-induced mucositis in mice. **Pharmacol. Res.** v. 41, n. 5, p. 526-32. 2000.

WU Z, HAN X, QIN S, ZHENG Q, WANG Z, XIANG D, ZHANG J, LU H, WU M, ZHU S, YU Y, WANG Y, HAN W. Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-fluorouracil in a mouse mucositis model. **Biomed Pharmacother.** 64(9):589-93. Nov, 2010.

WU ZQ, HAN XD, WANG Y, YUAN KL, JIN ZM, DI JZ, YAN J, PAN Y, ZHANG P, HUANG XY, WANG ZG, ZHENG Q. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. **Cancer Chemother Pharmacol.** 68:87-96. 2011.